

Tesis de Posgrado

Hidratos de carbono en *Cyttaria harioi* Fischer : Determinación de la estructura de un Pululano. Estudio de azúcares simples, aislamiento e identificación de ácido D-arabino hexulosónico y alfa, alfa-D-trehalosa

Waksman, Noemí Herminia

1977

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Waksman, Noemí Herminia. (1977). Hidratos de carbono en *Cyttaria harioi* Fischer : Determinación de la estructura de un Pululano. Estudio de azúcares simples, aislamiento e identificación de ácido D-arabino hexulosónico y alfa, alfa-D-trehalosa. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1528_Waksman.pdf
Waksman, Noemí Herminia. "Hidratos de carbono en *Cyttaria harioi* Fischer : Determinación de la estructura de un Pululano. Estudio de azúcares simples, aislamiento e identificación de ácido D-arabino hexulosónico y alfa, alfa-D-trehalosa". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1977.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1528_Waksman.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

HIDRATOS DE CARBONO EN CYTARIA CHARLOTI FISCHER

DETERMINACION DE LA ESTRUCTURA DE UN POLULARO

Estudio de azúcares simples . Aislamiento e identificación
de ácido D-arabino hexulosónico y alfa,alfa-D- trehalosa

NOEMI HERMINIA WAKSMAN

Tesis presentada para optar al título de Doctor en Química

(Orientación Química Orgánica)

1 9 7 7

,

En memoria de
mis padres

Agradezco al Dr. Alberto S. Gerozo, quien por su interés y dedicación hizo posible la culminación del presente trabajo, así como a la Dra. Rosa M. de Lederkromer por sugerir el tema y contribuir a mi formación científica

Agradecimiento también

- . Al Dr Kurt Tellenfels (Freiburgo, Alemania) por el envío de una muestra de pulularana
- . Al Dr. Marchal (Instituto de Investigaciones Bioquímicas) por el obsequio de una muestra de trehalosa, así como por la colaboración prestada.
- . A la Dra. H. B. de Deferrari y a la Lda. Marta Marcote por los microanálisis realizados
- . Al Sr. J. J. Ferrer y al Sr. Alejandro Russo por los espectros realizados
- . A la Dra. Alicia I. C. de Auer por su colaboración en los comienzos del presente trabajo
- . Al Dr. Víctor Segal por su colaboración
- . Al personal del Departamento de Química Orgánica por su cordialidad y afecto
- . A mis amigos por su constante apoyo

INTRODUCCION

Cyttaria harioti Fischer es una de las especies más abundantes perteneciente a la familia Cyttariaceae. En nuestro país se encuentra en los bosques patagónicos donde parasita distintas especies de *Nothofagus*: uno de los más comunes es el N. dombeyi (coihue) que dio origen al nombre vulgar "difueño del coihue" con que los habitantes del lugar conocían a este hongo. Dado que los Hidratos de Carbono constituyen más del 50% en peso del hongo y que no se habían realizado estudios químicos sobre los mismos en ninguna de las especies de Cyttaria, se comenzaron en este laboratorio los estudios estructurales, principalmente de los polisacáridos.

En este trabajo se describe la identificación y determinación cuantitativa de ácido D-arabino hexulosónico y de trehalosa aislados de un extracto acuoso y la estructura de un polisacárido soluble en agua.

La trehalosa ha sido encontrada en varias especies de hongos en los cuales desempeña un papel importante en su metabolismo. El ácido D-arabino hexulosónico no ha sido descrito anteriormente como componente de hongos al estado libre.

El polisacárido, que es el tercero obtenido homogéneo de esta especie, demostró ser un alfa-D-glucano de estructura relacionada con el denominado pululano que sólo se había aislado hasta el momento de algunas especies de Pullularias y de la levadura Tremella mesenterica.

Estos estudios pueden resultar de gran utilidad para esclarecer controversias en la taxonomía (Gamundí, 1971)

CAPITULO I

HONGOS DEL GENERO CYTTARIA . ESTUDIOS QUIMICOS REALIZADOS

HONGOS DEL GENERO CYTTARIA

Los hongos del género Cyttaria son parásitos de varias especies de Nothofagus en los cuales producen tumores característicos, llamados vulgarmente nudos que invaden el árbol causando su muerte. Esto hace que sean una grave amenaza para la supervivencia de nuestros bosques patagónicos. La clase a la cual pertenecen, Ascomycetes, incluye algunos de los hongos más destructores.

Algunas especies de Cyttaria son comestibles y los indígenas las utilizaban como alimento. También los araucanos preparaban con ellas una bebida alcohólica lo cual se explica debido a su alto contenido en hidratos de carbono.

No están muy distribuidos en la naturaleza. Se los ha encontrado sólo en el hemisferio sur: Sudamérica, Australia, Nueva Zelanda y Tasmania.

En América del Sur, en los bosques que se extienden en ambas laderas de los Andes desde aproximadamente los 30° de Latitud Sur hasta el Cabo de Hornos en Argentina y Chile, se encuentran las especies Cyttaria hookeri, C. johowii, C. exigua, C. darwinii, C. espinosae y C. berteroi. Por sus afinidades las dos primeras podrían formar un subgénero, incluyendo las restantes en otro (Gamundí, 1971). Estas apreciaciones morfológicas necesitan de los aportes de los datos químicos para establecer con mayor seguridad las subclasificaciones.

CLASIFICACION SISTEMATICA DE HONGOS

Comenzaremos por dar una breve clasificación sistemática de hongos, basada en la propuesta por Ainsworth según aparece en Introduction to Fungi (1970)

CLASE

ORDEN

ACRASIDOMYCETES		ACRASIALES (mohos mucilaginosos)
MYXOMYCETES (carecen de pared celular)		LABYRINTHUALES (parásitos marinos)
CHYTRIDIOMYCETES (Hongos con un solo flagelo posterior)		PLAMODIOPHORALES
		CHYTRIDIALES
		BLASTOCLADIALES
HYPOCHYTRIDIOMYCETES (Hongos con un solo flagelo anterior)		HYPOCHYTRIALES
OOMYCETES Hongos que se reproducen asexualmente por medio de esporas biflageladas		LAGENIDIALES (mohos del agua)
		SAPROLEGNIALES
		LEPTOMITALES
		PERONOSPORALES: incluye algunos de los parásitos de mayor capacidad destructiva. Los más conocidos pertenecen a la
		<u>Familia</u> : Pythiaceae
		<u>Género</u> : Pythium y Pytophthora
ZYGOMYCETES Hongos terrestres Producen zigosporas		MUCORALES (moho del pan, Rhizopus)
		ENTOMOPHTORALES: parásitos sobre insectos (Entomophthora muscae, hongo de las moscas)
TRYCOMYCETES Se asocian con los artrópodos		ECCRINALES
ASCOMYCETES hay varias subclases: HEMIASCOMICETIDAE		ENDOMYCETALES: incluye, entre otros, la <u>Familia</u> Saccharomycetaceae, donde se ubican las levaduras
Producen sus esporas dentro de ascos. Con esta clase comienzan los denominados Hongos superiores	PLECTOMYCETES	TAPHRINALES: parásitos de plantas superiores
		EUROTIALES (Aspergillales) son los mohos negros, verdes y azules
		ONYGENALES
		MICROASCALES
	PYRENOMYCETES (hongos con peritecio)	ERYSYPHALES
		SPHAERIALES: moho rosado del pan (Neurospora)
		HYPOCREALES
		CLAVICIPITALES: incluye los Claviceps (parásitos de gramíneas) y Cordyceps (parásitos de insectos)

C L A S E

O R D E N

ASCOMYCETES	DISCOMYCETES (cuerpo fructífero en forma de disco)	HELOTIALES (<i>Molinilia fructicola</i>) Algunos autores incluyen aquí a las Cyttariaceae PEZIZALES TUBERALES: trufas
	LABOULBENIO MYCETES	LABOULBENIALES
	LOCULOASCOMYCETES	MYRIANGIALES MICOTHYRIALES HYSTERIALES PLEOSPORALES DOTHIDEALES
DEUTEROMYCETES (hongos imperfectos)		SPHAEROPSIDALES MELANCONIALES MONILIALES: incluye la mayoría de los hongos importantes industrialmente: Penicillium y Aspergillus. También las falsas levaduras. <u>Familia</u> : Cryptococcaceae que comprende Cryptococcus, Rhodotorula, Candida <u>Familia</u> Moniliaceae que incluye los dermatófitos y causantes de micosis profundas (<i>Blastomyces brasiliensis</i>)
BASIDIOMYCETES son los hongos más evolucionados Producen sus esporas en basidios		TREMELLALES: hongos gelatinosos UREDINIALES: royas. Parásitos vegetales USTILAGINALES: carbones POLIPORALES: hongos corales y dentados <u>Familia</u> Polyporaceae que incluye los Polyporus u hongos en máscara, que atacan y destruyen la madera AGARICALES: setas u hongos en sombrilla (<i>Agaricus campestris</i> y <i>Amanita</i>) HYMENOGASTRALES LYCOPERDALES SCLERODERMATALES PHALLALES NIDULARIALES

LIQUENES: un liquen está constituido por la asociación de un hongo y un alga.
Los hongos son Pyrenomycetes, Dyscomycetes o Agaricales

CYTTARIA HARIOTI FISCHER

Es una de las especies más abundantes de las Cyttariaceae. Se la conoce vulgarmente como "dihueño del cohino" o "Llau-llau". Su posición dentro de la Clasificación sistemática es la siguiente

CLASE	Ascomycetes
SERIE	DISCOMYCETES
ORDEN	Cyttariales
FAMILIA	Cyttariaceae
GENERO	<u>Cyttaria</u>
ESPECIE	<u>Cyttaria harii</u>

Esta clasificación fue considerada por Gamundí (1971). El orden Cyttariales empalmaría los Discomycetes con los Sphaeriales ya que presenta características comunes a ambos.

Cyttaria harii Fischer fue descrita por primera vez por Fischer (1888) sobre un material de Nothofagus betuloides y N. antarctica recogido por P. Hariot durante una expedición científica.

El hongo predomina en primavera y verano. Los estromas jóvenes son rojo anaranjado, de 2 a 5 mm de diámetro y tiene la superficie cubierta con numerosas granulaciones negruzcas, fácilmente desprendibles. Cuando son adultos tienen de 2 a 4.5 cm de diámetro y dejan una matriz circular al desprenderse; los que quedan en el nudo toman color "ámbar"

El aislamiento y cultivo "in vitro" de especies de Cyttaria es muy difícil (Gamundí, 1971)

ESTUDIOS QUÍMICOS REALIZADOS SOBRE CYTTARIA HARIOTI FISCHER

Esta es la única especie de la familia sobre la que hay estudios químicos ya realizados.

Wiernik (1962) estudió por primera vez la composición química de Cyttaria harioti Fischer y obtuvo los siguientes resultados (Tabla 1)

TABLA 1

COMPOSICION QUIMICA DE CYTTARIA HARIOTI FISCHER

Extracto acuoso	33.4 %
Extracto alcohólico	9.4 %
Extracto etéreo	1.33 %
Humedad (Dean Stark)	16.2 %
Grasas (extracto etéreo)	1.33 %
Materias nitrogenadas (N x 5.7)	4.48 %
Cenizas (550°C)	1.53 %
Fibra cruda	14.70 %
Azúcares reductores	7.00 %
Azúcares invertibles	4.90 %
Hidratos de carbono sacarificables	41.50 %

Lederkremer y Ranalli (1967) estudiaron los azúcares simples y polioles presentes en el extracto acuoso de estromas de Cyttaria harioti Fischer. Los resultados, expresados sobre material seco, se observan en la Tabla 2

TABLA 2HIDRATOS DE CARBONO EN CYTTARIA HARIOTI FISCHER

<u>Componente</u>	<u>Porcentaje</u>
Glucosa	2.7
Fructosa	3.0
Sacarosa	4.5
Glicerol	3.7
D-arabitol	1.3
D-manitol	0.3

La diferencia entre el valor de azúcares reductores encontrado por Wiernik (7%) y el valor informado por Lederkremer y Ranalli (5.7%) se debería a la presencia de otros azúcares reductores en el extracto acuoso y que presentan, por cromatografía en papel, movilidad menor que la sacarosa. Aparentemente el principal es el ácido D-arabino hexulosónico, descrito en el presente trabajo.

Del extracto acuoso se aisló un polisacárido (A.F. Cirelli, 1971 y 1972) por precipitación con Etanol hasta una concentración del 50%. Su poder rotatorio era + 95.8 (KOH 1N). Se encontraron como componentes del mismo D-glucosa, ácido D-arabino hexulosónico y D-fructosa en la relación molar 98:6:1. El ácido D-arabino hexulosónico no había sido encontrado anteriormente en hongos.

Los estudios de oxidación con periodato, reducción e hidrólisis sugirieron la presencia de uniones (1→3), (1→6) y (1→4) que fue confirmado por los estudios de metilación.

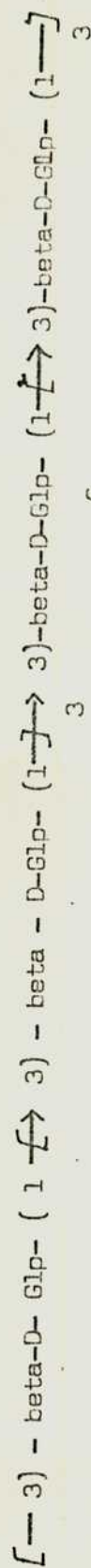
Por hidrólisis ácida parcial se aislaron y caracterizaron laminaribiosa (3-O-beta-D-glucopiranosil-Glucopiranosas); celobiosa (4-O-beta-D-Glp-D-Glp); isomaltosa (6-O-alfa-D-Glp-D-Glp) y oligosacáridos mayores. Por acetólisis y posterior desacetilación, se aislaron y caracterizaron laminaribiosa y laminaritriosa, y también oligosacáridos mayores.

De acuerdo con los resultados obtenidos se postuló una posible unidad repetitiva para el polisacárido (Figura 1)

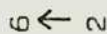
Recientemente Fernández Cirelli y Lederkremer (1976) publicaron los estudios estructurales sobre un glucano obtenido por extracción alcalina de la misma especie. Su poder rotatorio en $[\alpha]_D = +11$ (KOH 1N) y posee un esqueleto de beta-D-glucosa con uniones (1→3) con ramificaciones en la posición 6. Singh y col (1974) encontraron que este tipo de estructura tiene actividad antitumoral

FIGURA 1

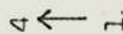
UNIDAD REPETITIVA DE UN HETEROPOLISACARIDO DE CYTTARIA HARIOI FISCHER



alfa - D - Glp



D-A. Arabino-hexulf



(alfa-D-Glp)₂



alfa - D - Glp

CAPITULO II

GLUCANOS AISLADOS DE HONGOS Y LEVADURAS

INTRODUCCION

Este capítulo tiene por finalidad dar una breve descripción de la estructura de los principales glucanos hallados en hongos.

Clasificaremos a los glucanos de acuerdo a la configuración de su unión glucosídica en alfa y beta glucanos, y dentro de estos se hará una subclasificación de acuerdo al tipo de unión glucosídica que presentan. Los polisacáridos mencionados se encuentran en los medios de cultivos (extracelulares), en las paredes celulares o en cápsulas que rodean las células.

La clasificación sistemática de hongos que aparece en el presente trabajo, permite ubicar las especies que se mencionan en este capítulo

El conocimiento de la estructura de los polisacáridos en general y de los glucanos en particular, puede ser de ayuda en el campo de la taxonomía, inmunquímica, biosíntesis y enzimología. Desde el punto de vista comercial los polisacáridos que forman soluciones viscosas tienen muchos usos potenciales como sustitutos de gomas vegetales.

GLUCANOS CON UNIONES ALFA GLUCOSIDICAS

POLIMEROS TIPO ALMIDON

Los polisacáridos semejantes al almidón fueron detectados primeramente por el color azul que dan con solución de I_2

Desde que se aislaron almidones de 20 especies distintas de Penicillium (Chrzaszcz, 1927), se prestó especial atención a la formación del mismo por levaduras. Muchas levaduras capsuladas del género Cryptococcus sintetizan almidón en medios líquidos a pH 5 o menor (Aschner, 1945)

Kooiman (1963) separó una amilosa exocelular producida a pH menor que 5 en medio líquido por Cryptococcus albidus y Cryptococcus laurentii. Los estudios de oxidación con periodato, rotación óptica y oxidación con hipoclorito sugirieron una estructura lineal con uniones glucosídicas alfa-D- (1→4) y con una longitud de cadena de aproximadamente 44 unidades. También se aisló una amilosa cristalina de Cryptococcus neoformans (Hehre, 1949) que tenía un índice de iodo y características de alfa y beta amilólisis similares a la amilosa de cereales.

Gorin y col (1966) aislaron amilosa de cultivos de Rhodotorula pombe y Rhodotorula macerans. El producto proveniente de la primera especie se caracterizó como amilosa usando técnicas clásicas. Los estudios de ultracentrifugación y medidas de viscosidad indicaron un \overline{PM}_w de 2.10^6 y un \overline{PM}_n de 7.10^5 ; la diferencia muestra la polidispersión de la misma. Estos valores son comparables con los obtenidos con amilosa de papa y son considerablemente mayores que los informados por Kooiman para la amilosa de Cryptococcus albidus.

Se encontró que la levadura Cr. laurentii secretaba, bajo ciertas condiciones, un polisacárido tipo almidón al medio de cultivo, concluyéndose que esto no era un proceso normal en la célula y sólo ocurría a bajos pH (Schultz, 1973).

GLUCÓGENO

El glucógeno fue reconocido como componente de hongos en 1885 (Frrera). Se detectó en numerosos Basidiomycetes y levaduras por el color que produce con una solución de I_2 / IK.

Harden y Young (1902) aislaron por primera vez el glucógeno de levaduras. El polisacárido aparentemente funciona como material de reserva y no como unidad estructural.

Las primeras comparaciones entre glucógeno de levadura de panadería y de origen animal, se hicieron sobre la base del color marrón rojizo que dan con solución de I_2 , su rotación específica y opalescencia de sus soluciones (Harden y Young, 1912).

Jeanloz en 1944 purificó glucógeno de levadura por electrodiálisis y encontró que el porcentaje de degradación con beta amilasa era comparable al obtenido con glucógeno de mejillones. Northcote en 1953 llevó a cabo una investigación estructural detallada sobre el glucógeno de células de levadura prensadas. Luego de una extracción con OHNa acuoso y caliente para eliminar posibles contaminantes, obtuvo el glucógeno con ácido acético diluido a 75°, con un rendimiento del 3.2%. Este método resultó más eficiente que el que implicaba una ruptura mecánica de las células. Los estudios de metilación y oxidación con periodato mostraron que su longitud de cadena era de 11-12 residuos de D-glucosa. La enzimólisis con beta amilasa dio maltosa con 50% de rendimiento. Aunque en este aspecto resultó similar al glucógeno de hígado de conejo, la viscosidad del extraído de levaduras era mucho mayor.

Manners y Khin Mannng en 1955 estimaron el \overline{PM}_w de glucógenos de levadura de cerveza por ultracentrifugación obteniendo como resultado 2.10^6

Se ha informado la presencia de glucógenos en un gran número de otros Eumycetes. La extracción con agua caliente de los cuerpos fructíferos de Polyporus giganteus dio glucógeno, un heteropolisacárido y un glucano con uniones beta (1→3) (Bhavanandan, 1964). El glucógeno fue purificado por precipitación fraccionada del complejo que formaba con cetiltrimetilamonio. Por métodos analíticos análogos a los usados por Northcote, se clasificó el producto como un glucógeno con longitud de cadena algo menor que los provenientes de otros orígenes. En la Tabla 3 se pueden ver las propiedades de dichos glucógenos comparados con los de hígado de conejo.

Una levadura inusual, morfológicamente difásica, Trigonopsis variabilis, contiene glucógeno en su forma celular elipsoidal, mientras que las formas celulares triangulares contienen otro glucano y un manano (Sentheshanmuganathan, 1962)

Recientemente Evans y Manners (1971) encontraron que las distintas muestras de glucógeno de levaduras, que mostraban variaciones en sus resultados de beta amilólisis y poder rotatorio, estaban contaminadas con un glucano beta-D- (1→6), ya que después de su tratamiento con amiloglucosidasa, el material restante daba gencibiosa y genciotriosa por hidrólisis ácida parcial

T A B L A 3

PROPIEDADES DE GLUCOGENOS DE DISTINTO ORIGEN

	Levadura panadería	Levadura cerveza	Polyporus giganteous	Hígado de conejo
$[\alpha]_D$ en agua	+ 187, +184	+ 193	+ 191	+ 196
Longitud de Cadena	11,12	13	8-9	12-13
Beta amilólisis (%)	46-48 , 50	44	42	43
Longitud de cadena (a) exterior	8	8	5-6	8
Longitud de cadena interior	2-3	4	2-3	4

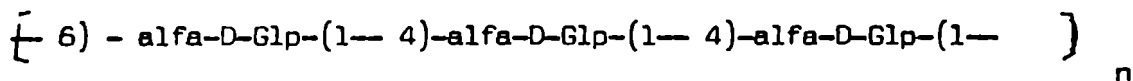
(a) número de residuos de D-Glucosa liberados por tratamiento con beta amilasa

Extractos de varias Dermatophyts mostraron que todos contenían un glucano alergénico. Por datos de beta amilólisis, oxidación con IO_4^- , poder rotatorio y espectro Infrarrojo se concluyó que al menos el 80% de las uniones del glucano eran α -D-(1 \rightarrow 4) con algunas uniones α -D-(1 \rightarrow 6). Es de notar que no se había encontrado previamente polisacáridos de este tipo en Dermatophyts (How, 1972, 1973).

PULULANO

En 1938 Bauer informó que ciertas especies del hongo Pullularia producían polisacáridos que formaban soluciones viscosas. En 1959, Bender y Wallenfels aislaron un glucano extracelular, soluble en agua, por fermentación de Pullularia pullulans (Dermatium pullulans, Aureobasidium). Este polisacárido se denominó pululano. La hidrólisis ácida parcial y el espectro infrarrojo mostraron que contenía uniones α -D-(1 \rightarrow 4) y α -D-(1 \rightarrow 6) glucosídicas (Wallenfels y col, 1961).

El aislamiento de la pululanasa de Aerobacter aerogens ayudó muchísimo en el análisis de este polisacárido. La acción de la enzima sobre el pululano daba lugar a la aparición de maltotriosa y cantidades menores de glucosa, maltosa y oligosacáridos mayores. Estos datos indicaron una estructura tipo poli-(1 \rightarrow 6)- α -D-glucosídica.



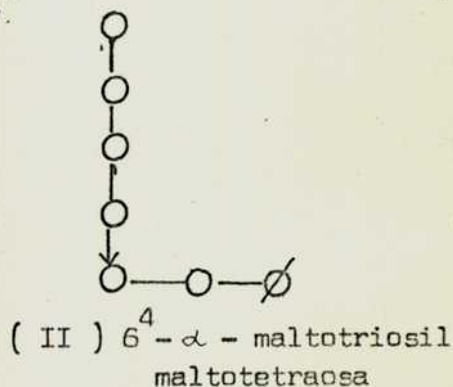
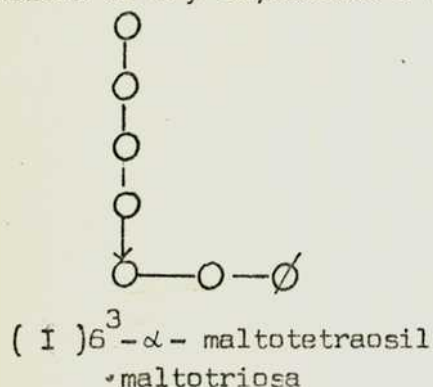
La acción de la pululanasa sobre un pululano degradado (obtenido por hidrólisis ácida muy suave del pululano) dio maltotriosa como único producto (Bender y Wallenfels, 1961).

El Peso Molecular del pululano, determinado por propiedades hidrodinámicas, era de 235.000.

La oxidación con IO_4^- indicó la presencia de uniones $\alpha\text{-D-(1}\rightarrow\text{4)}$ y $(1\rightarrow\text{6})$ en proporciones que oscilaban entre 2.0 y 2.2 a 1; el análisis por metilación produjo los resultados esperados para una estructura de este tipo (Wallenfels y col, 1965).

Un examen más detallado de los productos de acción de la pululanasa, mostró la presencia de un tetrasacárido, además de la maltotriosa (Catley y Whelan, 1966). En la muestra examinada, el tetrasacárido constituía aproximadamente un 7% del polisacárido. Este tetrasacárido se hidrolizaba totalmente con beta amilasa para dar maltosa; esto, junto con su poder rotatorio permitió caracterizarlo como maltotetraosa.

Cuando se llevó el pululano a un grado intermedio de hidrólisis con pululanasa, se aisló también un heptasacárido (Catley y Whelan, 1971) el cual por acción posterior de la enzima dio maltotetraosa y maltotriosa. Por reducción con BH_4Na de este heptasacárido y posterior hidrólisis con pululanasa, se obtuvo maltotetraosa principalmente, acompañada de pequeña cantidad de maltotriosa. Esto indicaba que el heptasacárido era una mezcla de I y II, estando I en mayor proporción



Nota

—	uniones $\alpha\text{-D-(1}\rightarrow\text{4)}$
↓	uniones $\alpha\text{-D-(1}\rightarrow\text{6)}$
○	extremo reductor
○	residuos de D- glucosa

La alfa amilasa no debería actuar sobre un poli(1→6) maltotriosa, sin embargo, su acción sobre el pululano se pudo atribuir a la hidrólisis de los residuos de maltotetraosa presentes. El pululano tratado previamente con alfa amilasa no liberaba maltotetraosa con pululanasa, sino 6³-alfa-D-glucosilmaltotriosa (III, Esquema 1). Esto mismo se comprobó comparando pululanos aislados de cultivos envejecidos (supuestamente expuestos durante más tiempo a la acción de la alfa amilasa celular) con los aislados de cultivos jóvenes; los primeros tenían menor Peso Molecular y daban menor proporción de maltotetraosa en la hidrólisis con pululanasa.

Aún no se sabía con certeza si los pululanos producidos por distintas cepas del microorganismo, eran uniformes en su estructura. Ueda y col en 1963 informaron que la estructura del polisacárido obtenido a partir de distintas cepas de Pullularia pullulans diferían considerablemente a juzgar por los datos de oxidación con IO_4^- .

Efectivamente, varias muestras de pululano crudo aislados de distintos cultivos, mostraron resultados considerablemente diferentes cuando se los sometió a la oxidación con IO_4^- y degradación enzimática. Pero luego de purificar los polisacáridos con hidróxido de cetiltrimetilamonio, se obtuvieron los mismos resultados para todos en la hidrólisis ácida, oxidación con IO_4^- y acción de pululanasa, isoamilasa y pululano-4-glucanohidrolasa (R. Taguchi y col, 1973). Dichos resultados se ven en la Tabla 4.

La posibilidad de que en el polisacárido hubiera alguna ramificación fue descartada por la acción completa de la enzima alfa-1,4-pululanasa, dando isopanososa como único producto.

Vale la pena aquí mencionar que el término pululano no se refiere actualmente a un único polisacárido, sino que denomina a la familia de polisacáridos relacionados.

ESQUEMA 1

ACCION ENZIMATICA SOBRE EL PULULANO

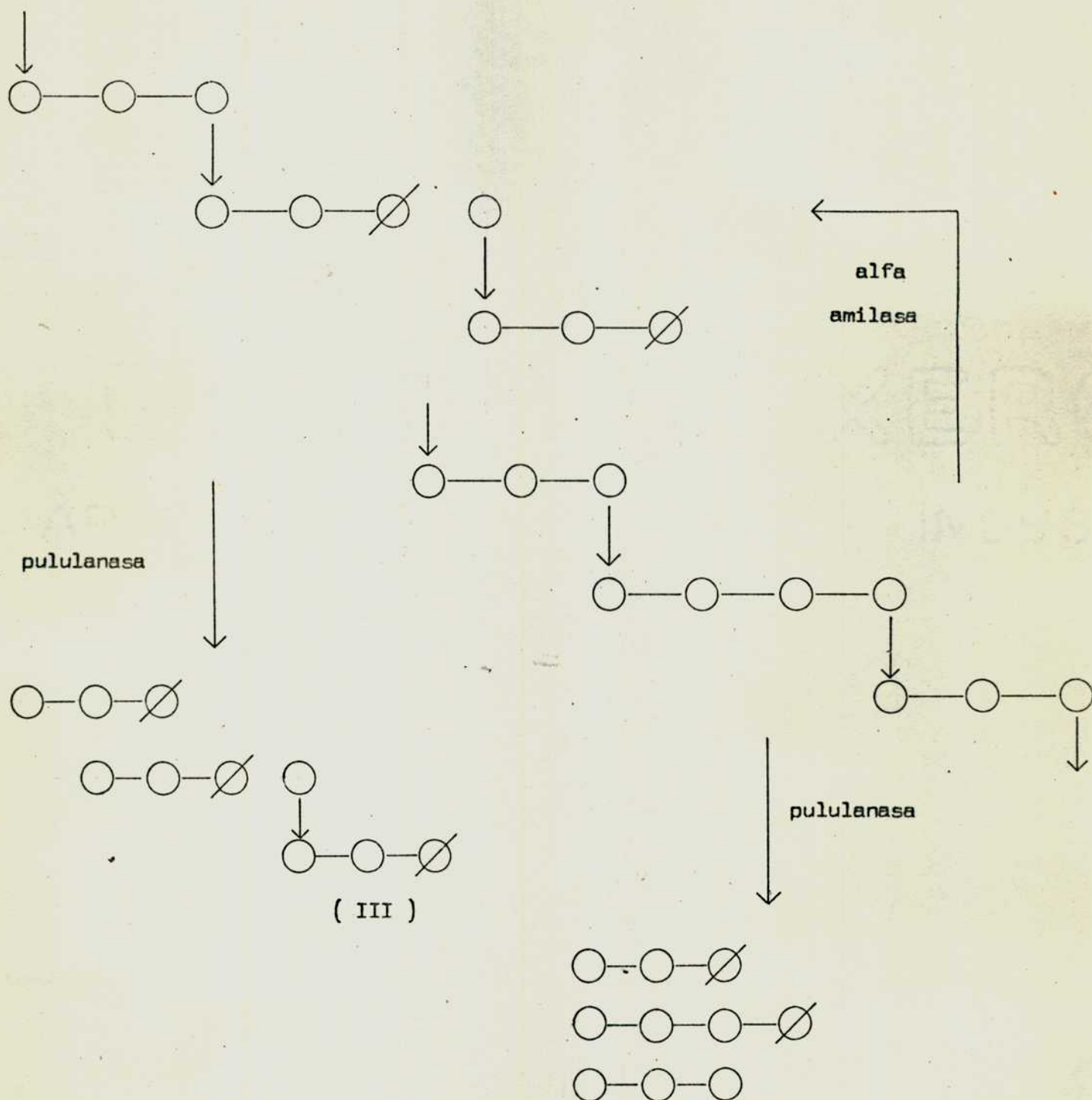


TABLA 4

COMPARACION DE PULULANOS AISLADOS DE DISTINTOS CULTIVOS

CEPA	$10_4/\text{mGa}$	HCOOH/mGa	% $1 \rightarrow 6$	% $1 \rightarrow 4$	% maltotriosa	% malto tetraosa
S-1	1.327	0.321	32.1	67.9	95	5
IFU 6353	1.327	0.316	31.6	68.4	93	6
OUT 4272	1.329	0.290	29.0	71.0	93	7

R. Taguchi y col, 1973

NIGERANO

Fue descubierto como componente miceliar del Penicillium expansum, por Dox y Neidig en 1914. Se extrajo con agua caliente y se aisló con un 2% de rendimiento. Dox (1915), obtuvo un producto similar de Aspergillus niger con un rendimiento del 6%. Barker y col en 1952, 1953 y 1957 informaron la determinación de su estructura. Tenía un alto poder rotatorio: $[\alpha]_D^{25} = +283$ (CHNa M) y no se hidrolizaba con enzimas amilolíticas. La metilación seguida de hidrólisis dio cantidades iguales de 2,3,6- y 2,4,6-tri-O-Metil-alfa-D-glucosa y 0.3% de 2,3,4,6-tetra-O-Metil-glucosa. La hidrólisis parcial del nigerano dio maltosa, nigerosa, O- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-O- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-D-glucosa y O- α -D-Glp-(1 \rightarrow 3)-O- α -D-Glp-(1 \rightarrow 4)-D-glucosa. Todos estos datos eran consistentes con la estructura propuesta (Fig 2)

Los micodextranos o nigeranos fueron detectados por Reese y Mandels (1964) también en un número de especies de Aspergillus y Penicillium. Los estudios conformacionales (Sundarajan, 1973) basados en consideraciones de energía mínima y permitiendo cuatro uniones rotables, mostraron que la unión H es posible en el nigerano cristalino entre los O-2 y O-3 de residuos contiguos en una unión alfa-D-(1 \rightarrow 4) y entre el O-2 y O-4 de residuos contiguos en una unión alfa-D-(1 \rightarrow 3).

Se aisló de varias especies que producen este polisacárido, una micodextranasa, enzima capaz de hidrolizar las uniones alfa-D-(1 \rightarrow 4) en micodextranos. La enzimólisis del micodextrano obtenido del Aspergillus CM 332 dio glucosa, nigerosa y O- α -D-Glp-(1 \rightarrow 3)-O- α -D-Glp-(1 \rightarrow 4)-O- α -D-Glp-(1 \rightarrow 3)-D-glucosa.

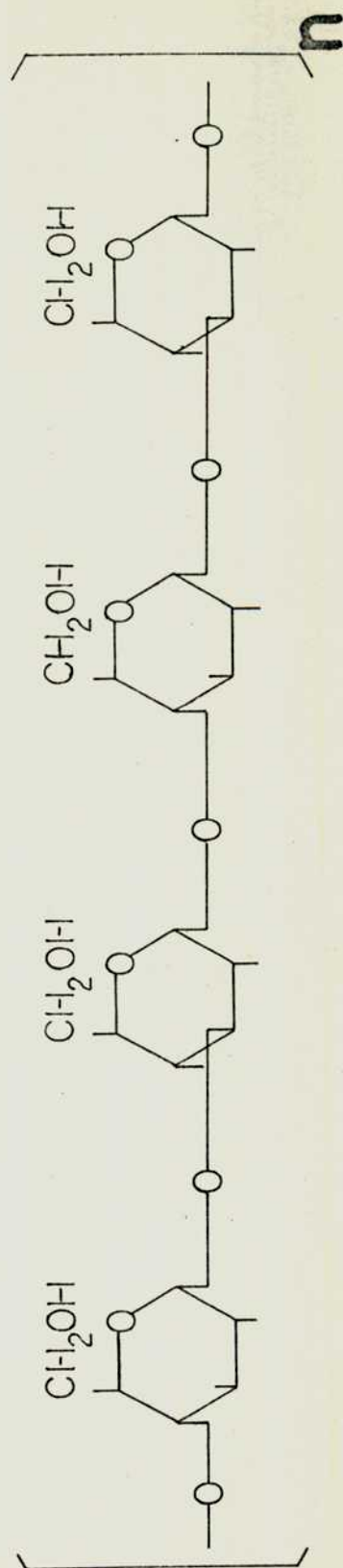
Con esta enzima se puso estudiar la estructura fina del nigerano y se postuló un mecanismo para su biosíntesis.

GLUCANOS (CON UNIONES ALFA-D-(1 \rightarrow 3))

De estromas de Polyporus betulinus se aisló un glucano (Proskuriakow, 1926), insoluble en agua caliente pero extraíble con álcali diluido en frío.

FIGURA 2

ESTRUCTURA DEL NIGERANO



En base a los estudios de metilación, Duff demostró (1952) que este polisacárido altamente dextrorrotatorio consistía principalmente en uniones alfa-D-(1→3) con 6% de extremos no reductores. Un glucano aislado por Ralph y Bender en 1965 tenía una estructura similar. Su poder rotatorio y espectro Infrarrojo indicaron que tenía uniones alfa-D. Además consumía 0.13 moles de IO_4Na / mGa con formación de 0.05 moles de HCOOH /mGa.

Cuando se hizo crecer Aspergillus niger NRRL 326 en almidón, se obtuvo un producto insoluble en agua caliente que contenía solamente glucosa: el pseudonigerano constituido principalmente por uniones alfa-D-(1→3) y alfa-D-(1→4) en relación 87:13 según lo establecieron Nordin y col en 1966. Esto contrastaba con el micodextrano obtenido cuando se hacía crecer el microorganismo en medios con glucosa o sacarosa. Su poder rotatorio era + 252 (OHNa M). Se estableció su estructura por estudios de oxidación con IO_4^- , metilación e hidrólisis. El grado de polimerización era 330 y se trataba de un glucano lineal (Horisberger, 1972).

Johnston (1965) también aisló pseudonigerano de micelios de A. niger crecidos en sacarosa. Está presente en un 26-42% en las paredes celulares y se pudo separar del micodextrano por su insolubilidad en agua caliente y solubilidad en OHNa acuoso.

Zonnaveld aisló en 1971 de Aspergillus nidulans dos polisacáridos similares a los obtenidos de A. niger. En 1972 estudió los cambios en la composición de las paredes celulares de dicho microorganismo y concluyó que el polisacárido con uniones alfa-D-(1→3) funcionaba como polímero de reserva y que la maduración comenzaba cuando la glucosa era eliminada del medio y había presente suficiente pseudonigerano en las paredes como para servir como fuente de carbono y energía.

OTROS

Se aislaron de Candida albicans y C. parapsilosis glucanos estructuralmente similares (Yu, 1967). En cada uno de ellos la principal característica estructural era una cadena de residuos alfa-D-glucopiranosícos con uniones 1→6 y una pequeña

proporción de uniones $1 \rightarrow 3$ en la porción lineal del polisacárido. En el que proviene de C. alticans, la ramificación ocurre casi exclusivamente en C-3 y C-6 de algunos residuos glucosídicos y en C-4 y C-6 de otros. Se encontraron glucanos similares en Saccharomyces cerevisiae.

Se aisló un polisacárido lineal de Tremella mesenterica NRRL Y-6158 (Fraser y Jennings, 1971) que parecía el glucano neutro obtenido de especies de Pullularia. Por hidrólisis ácida parcial se identificaron maltosa, isomaltosa, panosa e isomaltotriosa. No se atacaba con enzimas amilolíticas. Estos datos junto con los estudios de metilación, oxidación con IO_4^- hicieron concluir que el polisacárido era lineal con 200 unidades alfa-D-glucopiranosicas, 66% de las cuales era $1 \rightarrow 4$ y el resto $1 \rightarrow 6$.

GLUCANOS CON UNIONES BETA

CELULOSA

Aunque el componente más comúnmente encontrado en paredes celulares de hongos es la quitina, se ha informado la presencia de celulosa como componente menor en ciertos Phycomycetes quitinao-deficientes (Aronson, 1967). Se utilizaron cuatro test distintos para su detección

- 1) Tratamiento de las paredes con iodo
- 2) Características de solubilidad: insoluble en álcali acuoso, pero soluble en hidróxido cúprico amónico acuoso del cual reprecipita por acidificación.
- 3) La acción de la celulasa
- 4) Difracción de rayos X

Su presencia en Phytophthora parasitica fue informada por Dastur en 1913 y luego fue hallada en otras Phytophthoras. La diferenciación de la celulosa de las paredes celulares de Pythium myriophyllum del glucano con uniones beta (1→2) de Pythium butleri, ha tenido valor taxonómico (Mitchell y Sabar, 1966). Se detectó celulosa en otros hongos de la clase Oomycetes.

GLUCANOS CON UNIONES BETA (1→3)

Fischer demostró que Poria cocos, hongo que produce la putrefacción de la madera tiene una esclerotia con estructuras coraloideas que se hinchan y disuelven al tratarla con álcali acuoso. El material soluble, que se conoce como pachimano, es un glucano insoluble en agua con $[\alpha]_D^{20} + 31$ (OHNa) (Earl y Mc Gregor, 1934)

Warsi y Whelan en 1957 observaron que la formólisis parcial del pachimano, da series homólogas de oligosacáridos con uniones beta-D-(1→3) glucopiranósicas hasta 5 residuos en longitud, lo que estaba de acuerdo con la resistencia del pachimano a la oxidación con IO_4^- . La acetólisis parcial dio acetatos de D-glucosa, laminaribiosa y laminaritriosa. Estos datos, junto con los de metilación, concordaban con los que se esperaban obtener de un glucano lineal con uniones beta-D-(1→3) (Takeda, 1936).

Un extracto en agua caliente de Lentinus edodes (Agericales) dio 4 polisacáridos (Chihara, 1969), de los cuales dos exhibían actividad antitumoral. Uno de estos polisacáridos de poder rotatorio + 19.5 era un glucano lineal de Peso Molecular 950.000, con uniones beta-D-(1→3) que se llamó Lentinano. Sin embargo, las propiedades físicas y biológicas eran distintas de las del pachimano aislado de Poria cocos.

A partir de estos resultados se intentó volver a revisar la estructura del pachimano, ya que este no mostraba ningún tipo de actividad antitumoral. Se demostró que en realidad tiene 300 uniones 1→3 con 3 ó 6 puntos de ramificación (posiblemente en C-2) y algunas uniones internas 1→6 (Hoffman, 1971). La degradación de Smith del glucano oxidado con IO_4^- , daba un glucano lineal con actividad antitumoral, ausente en el polisacárido original (Chihara, 1970).

Es importante destacar el hecho que unas pocas ramificaciones 1→6 modifican de este modo la actividad biológica del polisacárido.

GLUCANOS CON UNIONES BETA-D-(1→6) Y BETA-D-(1→3)

El "glucano de levaduras" constituye una capa completa de las paredes celulares de Saccharomyces cerevisiae (levadura de panadería). Debido a que es insoluble en álcali caliente, Salkowski lo llamó celulosa de levadura, pero Zechmester y Toth (1934, 1936) reconocieron que sus propiedades eran distintas de la celulosa y demostraron por metilación la presencia de residuos beta-D-(1→3) glucopiranosicos. La rotación específica de + 13 era consistente con el predominio de uniones beta y estaba de acuerdo con el aislamiento de la osazona de la laminaribiosa.

Peat, Whelan y Edwards en 1958, precipitaron el glucano libre del glucógeno que a veces lo contaminaba. Por hidrólisis parcial obtuvieron glucosa, genciotiosa, genciotriosa, laminaribiosa, laminaritriosa, 6-O-beta-laminaribiosil-D-glucosa y 3-O-beta-genciotiosil-D-glucosa. La oxidación con IO_4^- mostraba que uno de cada 10 residuos de glucosa estaba unido por O-6 o era un extremo no reductor.

Estos resultados discrepaban con los de Bell y Northcote (1950), cuyos datos de metilación sugirieron uniones (1→3), algunas uniones (1→2) y extremos no reductores que daban lugar a 10% de 2,3,4,6-tetra-O-metil-glucosa.

Misaki y col en 1968 volvieron a estudiar este glucano y concluyeron que tenía uniones D-(1→3) con ramificaciones en C-6 y una pequeña porporción de uniones beta-D-(1→6). La hidrólisis suave del polialcohol resultante de la oxidación con IO_4^- y posterior reducción con BH_4Na , indicó la pérdida de una unidad de glucosa cada nueve, para dar un glucano de grado de polimerización 150, glicerol y una pequeña porporción de 1-O-beta- D -glucosilglicerol. La degradación del glucano intacto y del degradado con una beta-D-(1→3)-glucanasa de Rhizopus arrhizus dio los mismos productos : D-glucosa, laminaribiosa, genciobiosa y oligosacáridos mayores. De acuerdo así a un modelo de trabajo se llegó a proponer como estructura del glucano de Saccharomyces cerevisiae al representado en la Figura 3.

En 1969 Bacon y col observaron que en realidad el llamado "glucano de levadura" era una mezcla heterogénea de por lo menos dos polisacáridos, uno de ellos un glucano con uniones beta-D-(1→6), podía eliminarse por tratamiento con ácido acético.

Manners y col en 1973 estudiaron la estructura de estos dos polisacáridos. Concluyeron que el principal componente presente era un glucano con uniones beta-D-(1→3) y 3% de ramificaciones beta-D-(1→6) y PM de 2.4×10^5 ; el otro, que presentaba un poder rotatorio de -32 y grado de polimerización 130-140 era casi exclusivamente un glucano beta (1→6) altamente ramificado.

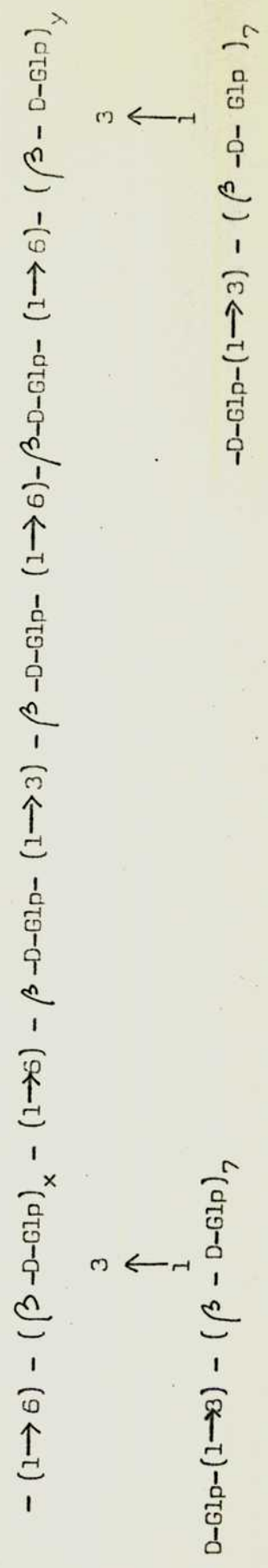
Se siguió un procedimiento para la extracción de estos glucanos que luego se adoptó como método general para otras levaduras. Se observa en el Esquema 2

Estos mismos estudios (Manners, 1974) se hicieron sobre preparaciones celulares de Kloeckera apiculata, Schizosaccharomyces pombe, Saccharomyces fragilis y S. fragmentatis. Todos mostraron tener heterogeneidades similares, aun cuando variaban las proporciones del glucano beta-D-(1→6) respecto del beta-D-(1→3).

La función del glucano con uniones 1→6 aún no se conoce.

FIGURA 3

ESTRUCTURA DEL GLUCANO DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE (Misaki y col)



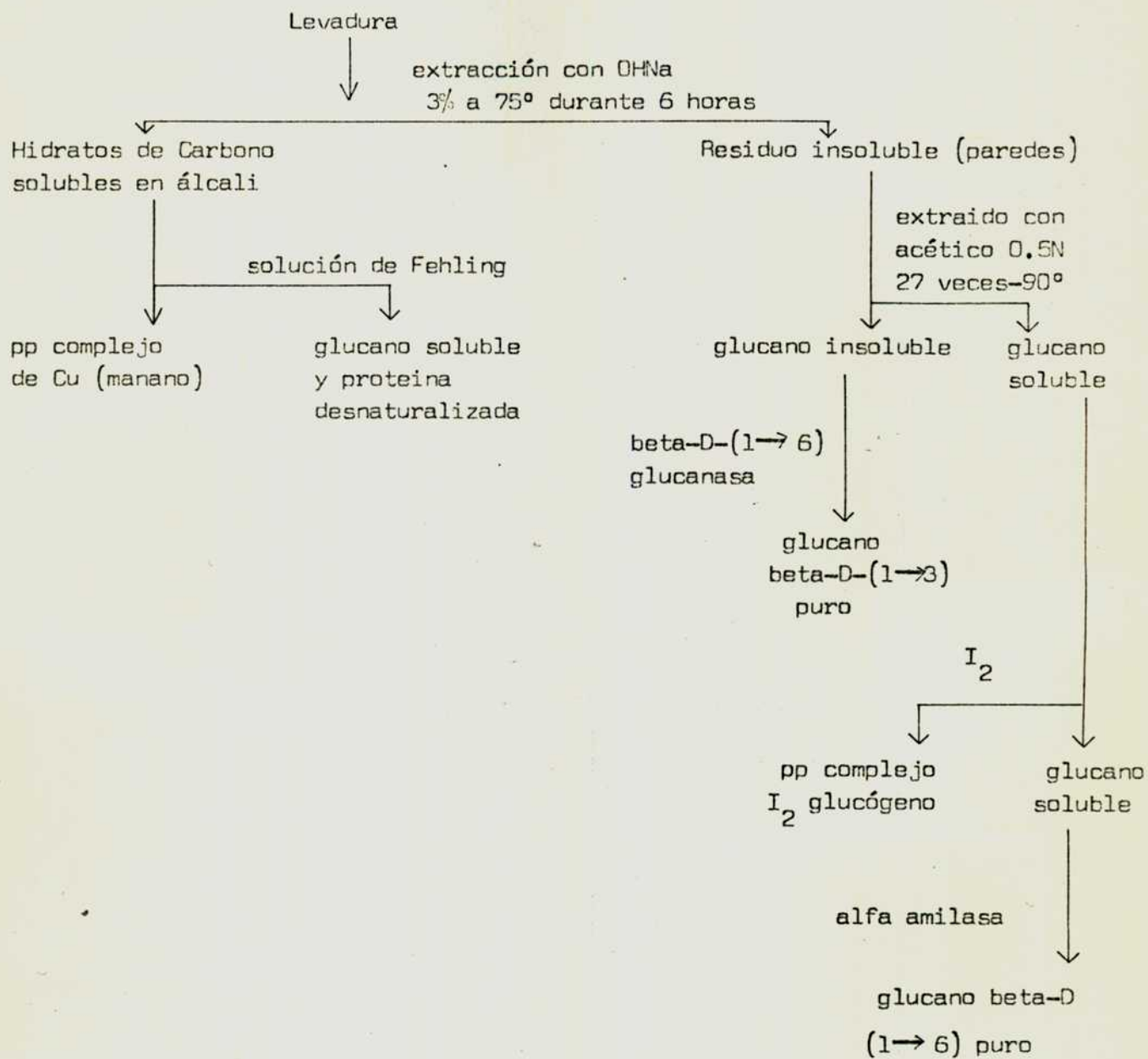
Grado de Polimerización 410

$$[\alpha]_D^{20} = -10 \text{ (dimetilsulfóxido)}$$

$$x + y = 40 - 50$$

ESQUEMA 2

EXTRACCIÓN DE GLUCANOS DE LEVADURAS



Como es soluble y de bajo Peso Molecular se piensa que puede ser un material de reserva. Otra alternativa es que sirva como material de relleno dentro de la red rígida provista por el glucano beta D- (1→3).

Estos estudios indican que la naturaleza heterogénea del glucano de levaduras es típica de muchas especies.

El hongo Pullularia pullulans que, como vimos, produce un glucano extracelular, el pululano, tiene un beta glucano adherido al micelio, soluble en álcali diluido con $[\alpha]_D = -37$. Los estudios de hidrólisis ácida y enzimática, oxidación con IO_4^- y metilación indicaron una estructura muy ramificada, consistente en uniones beta-D-(1→3) sustituidos, dos de cada tres residuos, en O-6 (Fig 4). Existe otro beta glucano en las paredes celulares de este hongo con una cadena principal consistente en unidades beta-D-(1→3)-glucopiranosicas sustituidas en O-6 por una sola unidad de glucosa. Las cadenas laterales se adosan cada 9 unidades (Fig 4). Luego de la extracción con álcali quedó en las paredes celulares otro glucano con uniones beta-D-(1→3) y beta-D-(1→6) (Brown y col, 1967).

Johnson, Smith y col (1963) aislaron un beta glucano similar al de Pullularia pullulans pero menos ramificado, de Sclerotium glaucum. Su $[\alpha]_D$ era -1 (OHNa), y el grado de polimerización 110. Los datos estructurales indicaron que se trataba de un glucano con uniones beta-D-(1→3), sustituido cada tres residuos por una unidad de glucosa. El ataque por una endo-beta-D-(1→3) glucanasa dio D-glucosa, genciobiosa y laminaribiosa, pero no laminaritriosa, dando evidencias de la estructura regular propuesta.

Perlin y Taber (1963) caracterizaron un beta-D-glucano exocelular de un organismo que produce el alcaloide causante del ergotismo: Claviceps purpurea. El glucano estaba estructuralmente relacionado con los glucanos de P. pullulans y S. glaucum y tenía una sola unidad lateral cada cuatro residuos de la cadena principal.

Numerosos glucanos similares a los descritos se patentaron y pueden ser utilizados en estado puro como agentes gelificantes, estables, no calóricos en la industria alimentaria (hallock, 1965).

Las paredes celulares de la levadura Candida albicans contienen glucano y manano extraíbles con álcali acuoso caliente. Bishop y col (1960) precipitaron el manano como complejo insoluble con Cu e investigaron la estructura del glucano que quedaba. El poder rotatorio era de -30 (OHNa M). Difería del "glucano de levadura" ya que era soluble en álcali y altamente ramificado. La metilación y formólisis dieron 2,3,4,6-tetra-O-Me-D-glucosa (7 moles); 2,3,4-tri-O-Me-D-glucosa (13 moles); 2,4-di-O-Me-D-glucosa (6 moles) y 2-O-Me-D-glucosa (1mol).

Investigaron también los glucanos extraíbles con álcali acuoso caliente de algunas Dermatophytas, Mycrosporium quinckeanum, Trycophyton granulosum, Tricophyton interdigitale, I. rubrum y I. schönleini. Los datos de metilación (Tabla 5) indicaron que se trataba de glucanos ramificados con distintas proporciones de uniones (1→3) y (1→6).

MICOLAMINARANOS

El laminarano es un polisacárido lineal, de reserva y que presenta uniones glucosídicas beta-D-(1→3). Es soluble en agua y de bajo Peso Molecular y ha sido aislado principalmente de algas (Phaeophyta y Chrysophyta)

Dentro de los Oomycetes se hallaron glucanos que caen dentro de la descripción general de laminaranos y se los llamó micolaminaranos (Wang y col, 1974). Son polímeros solubles en agua, de grado de polimerización 29-36, cuyo poder rotatorio y digestión completa con exo (1→3)-beta-D-glucanasa indican la existencia de uniones beta-D-(1→3) glucosídicas (Aronson y col, 1967). Los micolaminaranos tienen ramificaciones en C-6, pero no presentan residuos lineales 1→6 ni restos de manitol como las algas. Glucanos de este tipo se aislaron de algunas especies de los Penosporales como ser Phytophthora Cinnamoni y Phytophthora parasitica que constituyen hongos patógenos (Bartnicki García, 1967 y Zevenhuizen, 1969).

TABLA 5

PRODUCTOS DE HIDROLISIS DE GLUCANOS DE DERMATOPHYTAS METILADOS

Fragmento	Trycophytum granulosum	Trycophytum interdigitale	Microsporium quinckeanum	Trycophytum rubrum	Trycophytum schönléri
2,3,4,6-tetra-O-Me- D-glucosa (a)	21	12	10	17	16
2,3,4-tri-O-Me- D-glucosa	35	41	58	13	30
2,4,6-tri-O-Me- D-glucosa (b)	25	37	22	53	40
2,4-di-O-Me-D-glucosa	19	10	8	17	14

(Alfes, 1963 (a)

Bishop, 1966 (b)

El glucano aislado de P. cinerum tenía un 12% de ramificaciones en C-6 (Zaventzen, 1970). En el hongo P. pulvora se encontró un glucano con \overline{M}_w 4900 y una sola ramificación en C-6, por cada cadena (Wang, 1974).

Otra especie perteneciente a los Comycetes: Phytium acanthicum tiene un glucano cuya estructura aparece en la Fig 5. Por microscopía electrónica se vio que las paredes de las hifas de este hongo tienen dos texturas distintas; la superficie interior es microfibrilar y la exterior es no fibrilar. Las microfibrillas están cubiertas por una matriz amorfa, particularmente soluble en OHK acuoso y casi totalmente eliminable por tratamiento con exolaminarasa. Este material es el glucano de la Fig 5. Las microfibrillas permanecen luego del tratamiento con una beta-(1→3) glucanasa y está compuesta por un glucano con uniones beta-(1→4) y beta (1→3) sustituidas ocasionalmente en la posición 6.

La aparición de micolaminaranos en muchas especies de Comycetes y el hecho de no haberse encontrado glucógeno en los mismos, hace pensar que los micolaminaranos son los polisacáridos de reserva de esta clase de hongos.

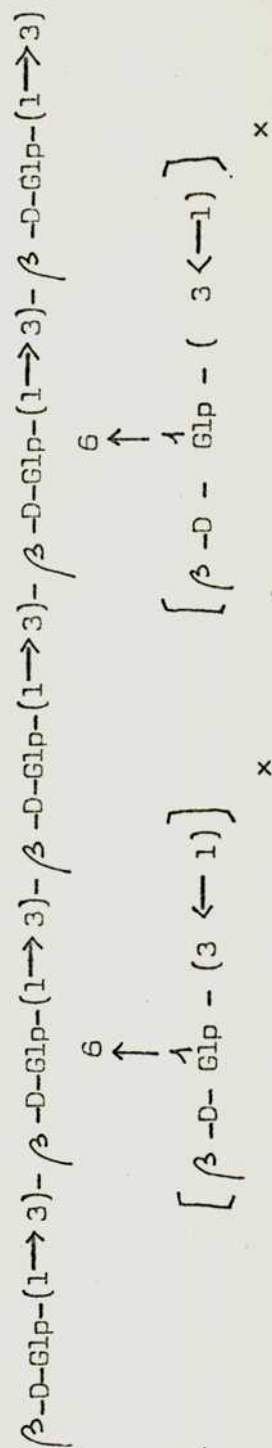
GLUCANOS CON UNIONES BETA-D-(1→6)

Hay pocos datos de este tipo de glucanos en la literatura.

Se aisló un polisacárido de Penicillium islandicum (Eaddiley y col, 1953) que contenía glucosa y ácido malónico en la proporción 2:1. Ebertt y Zenck (1967) aislaron un polímero altamente esterificado, llamado "ácido islándico" de P. islandicum que contenía glucosa y ácido malónico en proporciones equimoleculares. Su rotación específica y consumo de IO_4^- indicaban la presencia de uniones beta-D-(1→6). Los OH del C-3 estaban sustituidos por ácido malónico. Se patentó un método para producir este glucano de P. islandicum, ya que el polímero se usa como aditivo para bebidas, comidas y cosméticos (Nakamura, 1963).

FIGURA 5

GLUCANO DE PHYTIUM ACANTHICUM



x= 2 6 3

También el Penicillium luteum Zokal proporciona un mucílago exocelular: ácido luteico, que contiene glucosa y malónico en proporción 2:1. Anderson, Haworth y col mostraron en 1939 por metilación y medidas de poder rotatorio, que dicho glucano consistía en residuos beta-D-(1→6) glucopiranosicos, con un grado de polimerización de 84.

Polisacáridos mucilaginosos parecidos se aislaron de P. aqualeum, P. purpurescens, P. tardum, P. variabile, P. vermiculatum y P. Wortmanni (Nakamura, 1963).

Las paredes celulares de Schizophyllum commune F. tienen un glucano que da genciobiosa y no laminaribiosa por hidrólisis ácida parcial. Por otro lado, hemos visto que el llamado "glucano de levadura" es heterogéneo y que el componente que está en menor proporción es un glucano beta-(1→6) (Manners, 1973).

Otro glucano con este tipo de uniones encontrado en la literatura es el Pustulano, aislado del líquen Umbilicaria pustulate (Hellerquist, 1968). En él se determinó que si existe otro tipo de unión glucosídica correspondería a menos del 1%. Un glucano similar se aisló de las paredes de la forma levadura de Verticillium alboatum (Wang, 1970).

OTROS GLUCANOS

De los cuerpos fructíferos de Lentinus edodes se extrajeron cuatro polisacáridos, de uno de los cuales con uniones beta-D-(1→3) glucosídicas ya se hizo referencia. Otro era similar al glucógeno con una longitud de cadena promedio de 6 residuos y un tercero, que al igual que el primero, mostraba actividad antitumoral, consistía en uniones beta-D-glucopiranosicas de las cuales 66% eran 1→3 y las restantes 1→4 (Shida y col, 1971).

Los polisacáridos de Gyrophora esculenta Miyoshi y Lasallia papulosa Llamó también tienen el mismo tipo de uniones y presentan actividad antitumoral (Nishikawa, 1969).

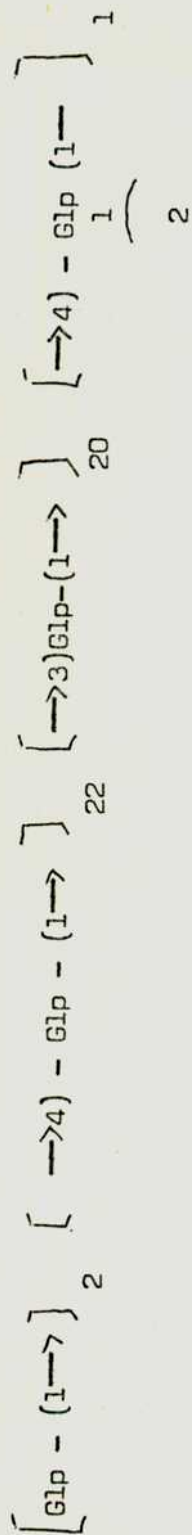
Tres especies de líquenes que pertenecen a las Umbilicarias contienen costulanano parcialmente O- acetilado en una forma soluble en agua. Estos polímeros mostraron tener actividad antitumoral (Takeda, 1970).

Se aisló un beta glucano soluble en agua de las paredes celulares de Parasidiomyces C1 200. Por su poder rotatorio y resultados de estudios de metilación, oxidación con IO_4^- y degradación enzimática se concluyó que tenía uniones beta-D-(1→6) , (1→3) y (1→4) llevando aproximadamente la mitad de los residuos unidos por 1→3 ramificaciones en C-6 (Bush, 1972). Un polisacárido semejante se aisló de Pullularia pullulans (Elinor, 1972).

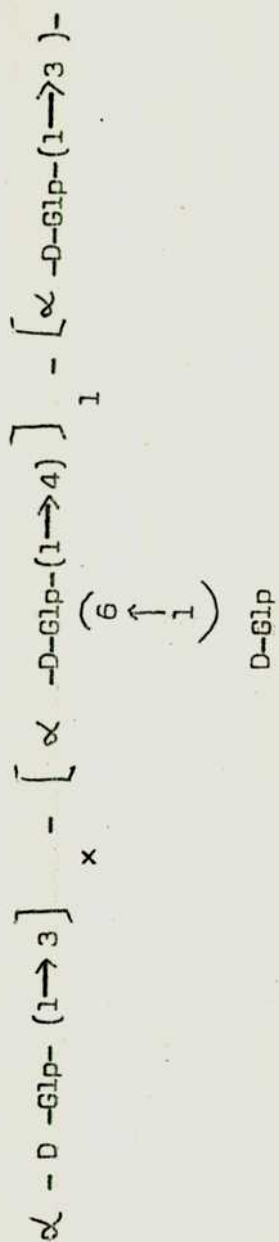
De un liquen del roble se aislaron dos glucanos. Uno de ellos con $[\alpha]_D + 217$ y PM 8000 era transformado en un 45% en glucosa con alfa amilasa. Por estudios de metilación y oxidación con IO_4^- se concluyó que se trataba de una cadena lineal (1→3) y (1→4) con ramificaciones en C-2 (Fig 6, I). El segundo glucano con $[\alpha]_D + 152$ se extrajo con OHNa 5% y se concluyó que era una estructura del tipo II (Fig 6).

FIGURA 6

GLUCANOS DE UN LIQUEN DEL ROBLE



(I)



(II)

Hraniasavlevic, 1975

CAPITULO III

DETERMINACION DE ESTRUCTURAS DE POLISACARIDOS

M E T O D O S A N A L I T I C O S E N Z I M A T I C O S

INTRODUCCION

En los últimos años los métodos clásicos de oxidación con IO_4^- , análisis por metilaciones, fragmentaciones, etc, usados en el análisis estructural de polisacáridos, han sido suplementados con el uso de los agentes naturales de su propio catabolismo: las enzimas.

Una revisión detallada de los métodos clásicos anteriormente mencionados puede encontrarse en la Tesis doctoral de la Da Alicia Fernández Cirelli (1972).

Los primeros intentos de obtener información estructural usando enzimas degradativas fueron considerados con cierto recelo por los químicos, pero ahora que se conoce más acerca de ellas, particularmente en cuanto a sus especificidades y mecanismos de acción, se ha generalizado su uso. Gran auge al empleo de estos métodos lo dio el hecho de encontrarse que la biosíntesis de polisacáridos no ocurre por reversión directa de la acción hidrolítica enzimática (Nikaido y Hassid, 1971).

Los métodos clásicos y enzimáticos se complementan de diversas maneras. Pueden involucrar una caracterización enzimática de productos de bajo Peso Molecular obtenidos por procedimientos clásicos de degradación o caracterizar por métodos no enzimáticos los productos de hidrólisis enzimática. La información que se obtiene es tanto cualitativa como cuantitativa.

Para el análisis enzimático de la estructura de polisacáridos, las enzimas más utilizadas son las de tipo hidrolítico y a ellas nos referiremos en este capítulo. Además, consideraremos en detalle las enzimas amilolíticas pues son las que se han usado en nuestro trabajo experimental.

CONSIDERACIONES GENERALES

Para poder utilizar las enzimas como herramienta de análisis, es preciso comprender los principios básicos de enzimología, especialmente en lo que se refiere a cinética y técnicas de purificación.

PREPARACION

Cuando la enzima no es comercial es necesario considerar la elección de la fente de la misma. Deben tenerse en cuenta factores como la facilidad de obtención del material inicial y la diferencia de especificidad de la misma enzima proveniente de distintos orígenes. Además debe elegirse aquella que requiera el menor número de pasos de purificación y en general evitar las fuentes donde coexiste con otra enzima difícil de extraer o que pueda interferir con el uso propuesto.

Cuando la enzima adecuada no se conoce o está presente como componente menor de una mezcla de difícil purificación, se utiliza el método de inducción en microorganismos. Se hace crecer el microorganismo en una fuente de carbono elegida, la cual es frecuentemente el polisacárido para el cual se busca la enzima hidrolítica. Como ejemplo podemos mencionar la exo-mananasa obtenida por crecimiento de especies de Arthrobacter en manano de levadura (Jones y col, 1969) la micodextranasa, por crecimiento de Penicilium melinii en nigerano (Reese, 1964) y la pululanasa inducida en Aerobacter aerogens por maltosa, almidón soluble o pululano (Mercier y Whelan, 1972). A veces se utilizan sustratos modificados, por ejemplo ésteres palmíticos de isomaltosa para la inducción de dextranasa (Reese, 1969). Este procedimiento es útil cuando el inductor actúa también como represor; en este caso se evita la represión supliendo lentamente el disacárido que se forma por acción de esterases inducidas en los ésteres palmíticos.

CRITERIO DE PUREZA

El uso de preparaciones impuras generalmente lleva a resultados erróneos o ambíguos. Por ello es esencial una evaluación del grado de pureza de cualquier preparación enzimática.

Los dos métodos más usados para determinar el grado de homogeneidad en preparaciones enzimáticas son la ultracentrifugación y el análisis electroforético. Un pico agudo de sedimentación en la ultracentrífuga indica claramente homogeneidad. Sin embargo es más sensible el método de electroforesis en gel de poliacrilamida, para detectar impurezas menores. Chambrach y col en 1967 emplearon una muestra doble, en una localizaban la proteína por un procedimiento colorimétrico y en la otra localizaban la enzima. Así se podía deducir cual era el componente de la fracción proteica que tenía la actividad enzimática deseada.

Generalmente el criterio de pureza utilizado para el análisis estructural es la ausencia de enzimas de actividad interferente. Esto se consigue purificando la enzima hasta que no haya acción sobre sustratos que detectarían dicha actividad. De este modo, una preparación enzimática desramificante de almidón o glucógeno será funcionalmente pura si no contiene otras enzimas amilolíticas o alfa-D-glucosiltransferasas.

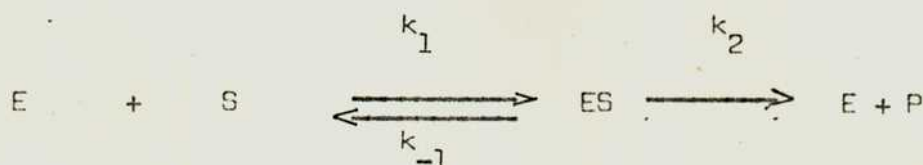
También se pueden obtener resultados aceptables usando preparaciones en las cuales se inhibe selectivamente la actividad interferente. Las alfa y beta-D-glucosidasas se inhiben selectivamente en exo y endo glucanasas usando preparaciones de alcoholes polihídricos como 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol (TRIS) ; glicerol o eritritol (Keleman y Whelan, 1966). Sin embargo, esto es a menudo menos satisfactorio que la remoción completa del contaminante.

CINETICA ENZIMATICA

Los estudios de cinética enzimática se basan en la suposición de que la velocidad de la reacción catalizada es directamente proporcional a la concentración de la enzima.

$$v = k[E] \quad (1)$$

La teoría de Michaelis-Menten (1913) explica el efecto de la concentración de sustrato en términos de un equilibrio entre la enzima libre (E), el sustrato (S) y un complejo enzima sustrato (ES) el cual se rompe para dar enzima y producto (P).



Donde se supone que k_2 es mucho menor que k_{-1}

$$\text{Se considera además una } K_s = \left(\frac{[E] + [C]}{[S]} \right) \quad (2)$$

Donde C es la concentración del complejo

$$\text{Como } V_{\text{total}} = k_2 [C] = k_2 [E][S] / K_s + [S] \quad (3)$$

Si $S \gg K_s$, entonces la velocidad máxima obtenida cuando la enzima está saturada por el sustrato

$$v = V_{\text{max}} / \left(K_s / [S] + 1 \right) \quad \text{ecuación de Michaelis}$$

de donde se define la constante de Michaelis (K_m) que es el valor de [S] que da $v = V/2$ experimentalmente.

Los estudios de K_m (recíproca de la afinidad de la enzima al sustrato) y V (relacionada con la ruptura de ES) permiten investigar la formación y ruptura del complejo.

Dentro de los estudios cinéticos hay que tener en cuenta la presencia de inhibidores que se dividen en :

Competitivos: cuando alteran el K_m

No competitivos: cuando no alteran K_m pero disminuyen V

Las enzimas son activas en rangos estrechos de pH. El efecto total del pH en la actividad enzimática se considera que se debe a la ionización o desionización de los grupos ionizables en el centro activo o cerca de él. Entonces se debe tener en cuenta de elegir un pH al cual la enzima sea tanto activa como estable.

Otro factor a considerar es la temperatura. Generalmente, la estabilidad de una enzima decrece al aumentar la temperatura, mientras que la velocidad de la reacción catalizada aumenta. Esto produce una temperatura óptima a la cual ambos efectos se balancean.

A veces las enzimas requieren cofactores para activarlas o estabilizarlas. Así el Ca^{++} debe estar presente en preparaciones de alfa amilasa para estabilizarla, particularmente si hay proteasas presentes (Fischer, 1960). Algunas beta-D-glucanasas son inactivas en ausencia de dicho catión.

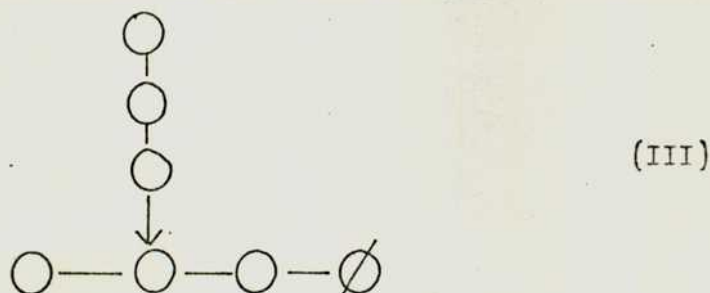
ESPECIFICIDAD

Antes de usarse una enzima, debe ensayarse su especificidad. Esto se realiza midiendo su velocidad de acción y el grado de degradación de una serie de compuestos modelo de estructura definida. Se encuentran frecuentemente en la literatura enzimas de especificidad no definida que se usan para degradar polisacáridos de estructura desconocida. Esto no conduce a buenos resultados pues, como subrayó French (1960), el mismo experimento no puede revelar simultáneamente la estructura del sustrato y la acción y especificidad de la enzima.

Tres requerimientos tienen las glicosilhidrolasas:

- i) Tipo de unión hidrolizada
- ii) glicona
- iii) aglicona

Algunas enzimas son altamente específicas, como la isoamilasa que tiene una especificidad que cubre al menos cuatro unidades. El sustrato más pequeño sobre el que tiene lugar su acción es 6³-alfa-maltotriosil-maltotetraosa (III)



Tanto la unión alfa-D-(1→6) como las tres uniones alfa-D-(1→4) del extremo no reductor del punto de ramificación, están involucradas en la especificidad

Por otro lado la laminarasa de Rhizopus arrhizus (Parrish y Reese, 1960) tiene como único requerimiento la presencia de una unión beta-D-(1→3), pero el residuo de D-glucosa sustituido en O-3 puede a su vez tener una unión beta-D-(1→3) o beta-D-(1→4).

Cuanto más altamente específica es la enzima, más útil nos resulta. La información estructural que se puede obtener de enzimas de baja especificidad es muy poca. Por ejemplo la beta glucosidasa extraída de emulsina de almendras es tan poco específica que su acción sólo nos indica que hay un extremo no reductor con residuos unidos en posición beta. Nada nos dice acerca de qué monosacáridos existen ni del tipo de unión involucrada.

MECANISMO DE ACCION

Distinguimos dos tipos principales:

Endo: ruptura del polisacárido en fragmentos por hidrólisis de todas las uniones susceptibles al azar.

Exo: degradación del polisacárido de a pasos, desde el extremo no reductor liberando mono u oligosacáridos hasta que se llega a una característica estructural (por ejemplo una ramificación) que detiene su acción.

Hay varios métodos para determinar por cuál mecanismo actúa una enzima.

Uno de los primeros que se utilizaron consiste en observar los cambios de viscosidad de la solución, dado que la ruptura endo provoca un rápido decrecimiento de dicho parámetro, mientras que una degradación por pasos lo hace decrecer más lentamente.

El fraccionamiento cromatográfico después de la hidrólisis parcial permite distinguir entre los dos tipos de acción. La exo da un único producto, cromatográficamente móvil, mientras que la endo proporciona una serie de productos cuyo tamaño va desde el oligosacárido más pequeño que puede producir la enzima hasta casi el material inicial. Así Drummond y Whelan en 1969, demostraron que la acción de la pululanasa en el pululano es endo pues su acción da lugar a series homólogas consistentes en residuos de alfa-D-maltotriosas unidas a través del O-6. Este resultado contradijo un estudio previo realizado por Wallenfels y col, 1969, quienes por evidencias de CGL demostraban que la enzima actuaba de modo exo liberando maltotriosa.

A veces se usa la cromatografía a través de tamices moleculares (Sephadex o Biogel). Un mecanismo de tipo exo da dos picos solamente los cuales, si se usa el medio apropiado, son respectivamente excluido y retenido por el gel empujando luego como un único pico agudo. Se puede medir el grado de polimerización del material no excluido a distintos grados de hidrólisis del sustrato (Tung, 1969). Para una enzima exo dicho parámetro permanece constante en todo momento, mientras que la acción endo lo hace disminuir constantemente.

Debe tenerse en cuenta que la aplicación de estos métodos a ciertos sustratos moleculares como glucógeno y amilopectinas, puede conducir a resultados erróneos, cuando efectos estéricos fuerzan a algunas enzimas endo a actuar por un mecanismo exo aparente.

Una tarea difícil ha sido la detección de enzimas endo en preparaciones de exo enzimas.

La presencia de una endo enzima hace que las mediciones carezcan de sentido, ya que su falta de requerimiento para una cadena terminal puede hacer que ciertos residuos se tornen susceptibles a la acción de la exo enzima. Aún trazas de la endo son suficiente para crear dificultades y tales cantidades pequeñas pueden ser extremadamente difíciles de detectar.

En las preparaciones de glucoamilasa se suele detectar alfa amilasa como impureza. Smith y Whelan en 1970 y Marshall y Whelan en 1971, desarrollaron un procedimiento para detectar tales impurezas.

Se preparó un sustrato con bloqueos a la exo enzima, obtenido por una oxidación limitada con IO_4Na . La comparación de la acción sobre este sustrato de glucoamilasa con y sin contaminación se ve en la Fig 7. La acción de la glucoamilasa cristalina cesa después de 4-5% de hidrólisis que corresponde a la remoción de todos los residuos susceptibles (a). La presencia de alfa amilasa hace factibles de ser hidrolizados otros residuos (b) a partir de su acción sobre el sustrato (donde indica la flecha).

Este es un método completamente general aplicable a cualquier polisacárido y a su exo enzima apropiada. Estos sustratos oxidados se usan también para probar el mecanismo de acción de una dada enzima, siendo los más utilizados la amilosa y el pululano oxidados.

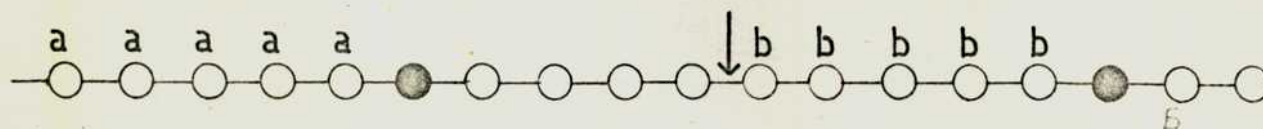
TEORIA DE LA DEGRADACION POR PASOS DE POLISACARIDOS LINEALES

La degradación de los polímeros se puede considerar que puede proceder según tres esquemas diferentes:

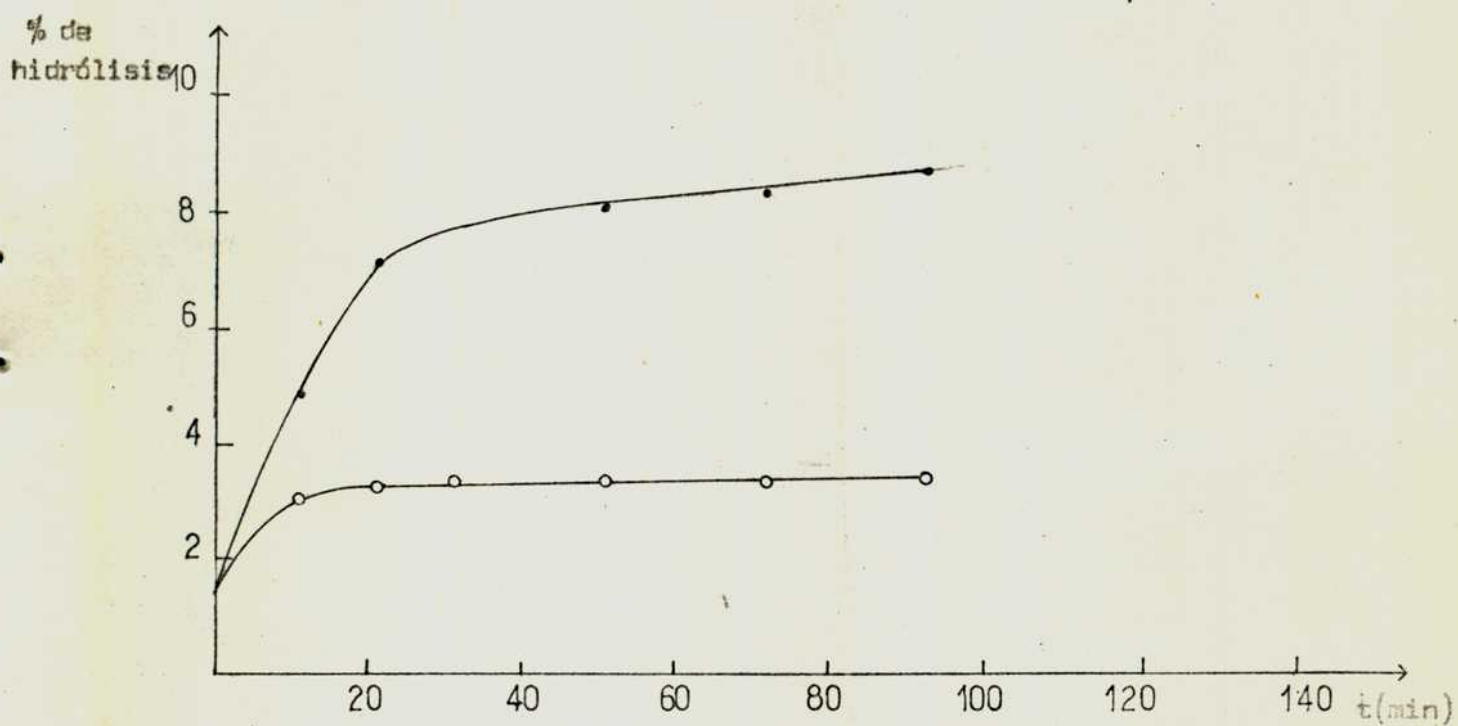
- (1) Mecanismo de cadena única: se forma el complejo ES y luego la molécula de sustrato se degrada completamente antes de que la enzima difunda para atacar otra molécula de sustrato.
- (2) Degradación en multicadena: Aquí, luego de la formación del complejo ES, la enzima difunde fuera de la molécula de sustrato luego de romper una sola unión.
- (3) Ataque múltiple: es un intermedio entre los dos anteriores

En el Esquema 3 se pueden ver representados estos tres mecanismos.

FIGURA 7

ACCION DE GLUCOAMILASA SOBRE LA AMILOSA PARCIALMENTE OXIDADA

Amilosa parcialmente oxidada con IO_4^- (5%)

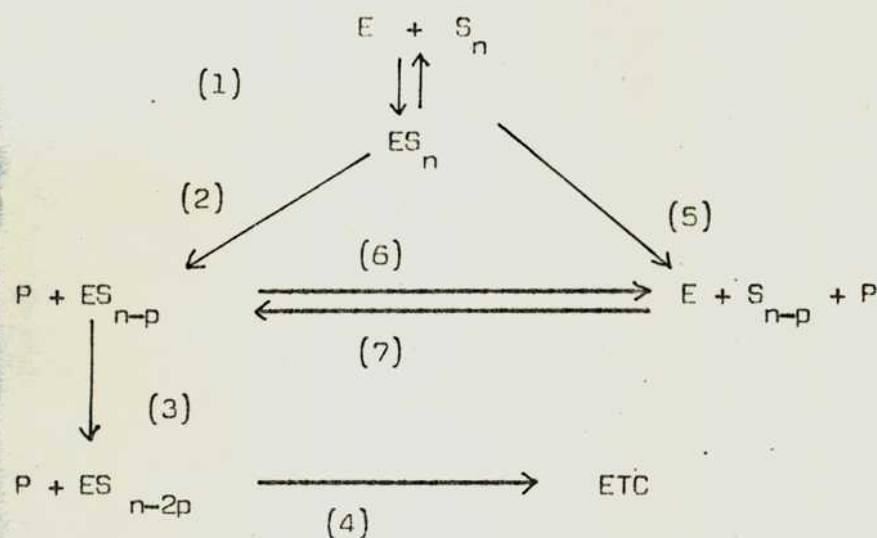


○ glucoamilasa cristalina pura

• glucoamilasa con contaminación de alfa amilasa

ESQUEMA 3

DEGRADACION POR PASOS DE POLISACARIDOS LINEALES



La degradación por cadena única progcede por (1) , (2) , (3) , (4) , etc

La acción en multicadena por (1) y (5) ó (1) , (2) y (6) seguido en (7) de la recombinación de la enzima con la misma u otra molécula de sustrato.

PROBLEMAS ASOCIADOS CON EL USO DE ENZIMAS

Se ha visto ya la importancia de la pureza en las preparaciones enzimáticas. Si hay presente más de una enzima que actúa sobre el sustrato o sus productos de degradación, el resultado obtenido será a menudo ambiguo y sin sentido. Lo mismo sucede cuando la enzima en cuestión no está adecuadamente caracterizada.

Un inconveniente potencial asociado con el uso de algunas enzimas, es la posibilidad de obtener resultados artificiales a través de la acción sintética de las hidrolasas. Tales productos pueden provenir de una reversión enzimática, como sucede con la emulsina de almendras (S. Peat, 1952) o por transglicosilación donde la porción de la glicona del sustrato es transferida a otro azúcar. Generalmente tales reacciones son más intensas cuando se usan extractos crudos, lo que indica que probablemente se deban a la presencia de contaminantes. Sin embargo hay casos en que la posibilidad de catalizar tales reacciones parece ser una propiedad inherente a la enzima.

Debe considerarse también el estado físico del sustrato. Si es un polisacárido insoluble carece de significado el hecho de que una enzima no lo ataque. El paramilón, beta-D-glucano de Astasia ocellata (Manners, 1966) no puede ser degradado con una beta-D-(1→3)-glucanasa de malta purificada, aunque su estructura es tal que debería producirse el ataque enzimático. A veces se obvia esta dificultad efectuando la hidrólisis en $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ (Tung y Nordin, 1970) en el cual muchas enzimas son activas y el polisacárido puede solubilizarse aunque sea insoluble en agua.

Hay casos en que es conveniente dejar que dos enzimas actúen simultáneamente en el sustrato, por ejemplo en la degradación de glucógeno por acción de beta amilasa y pululanasa (Abdullah, Wallenfels y col, 1966). Sin embargo, la acción de dos enzimas juntas puede producir resultados inesperados. Perlin en 1965 observó que la acción conjunta de dos enzimas hidrolíticas del liquenano, resultaba en la inhibición de la acción de una de ellas. Por otro lado durante la acción simultánea de alfa amilasa y H-enzima sobre panosa (6^2 -alfa-glucosilmaltosa) se notó un efecto sinergista pues ninguna de ellas, por separado, actúa sobre el oligosacárido y juntas lo degradaron.

Es esencial tener en cuenta la estabilidad de la enzima en las condiciones que se van a utilizar (especialmente cuando se realizan determinaciones cuantitativas). El caso de la hidrólisis podría deberse, no a la ausencia de enlaces susceptibles, sino a la pérdida de actividad del catalizador. Esto puede ser originado por la presencia de inhibidores en el sustrato o simplemente por falta de estabilidad de la enzima en las condiciones utilizadas.

Otro factor a considerar es la concentración. A veces la especificidad aparente de una enzima parece cambiar cuando se la usa a distintas concentraciones. Esto que parece obvio, a menudo es ignorado como surge de las controversias respecto de la especificidad de la alfa amilasa, beta amilasa y R enzima (Whelan, 1953).

Se debe tener cuidado de evitar la contaminación microbiana en los preparados enzimáticos, particularmente durante incubaciones largas. Esto se logra agregando tolueno o algún antibiótico a la mezcla de reacción, pero se debe estar seguro de que estos agentes no interfieren con las mediciones analíticas.

MÉTODOS ANALÍTICOS ENZIMÁTICOS

Se pueden encontrar muchos en la literatura, pero mencionaremos aquí los tres más utilizados en la determinación de estructuras de polisacáridos.

1.- Hidrólisis enzimática total de polisacáridos a monosacáridos

Es un método rápido y sencillo. Se requiere muy poco material y no hay reacciones laterales de descomposición como ocurre durante la hidrólisis ácida. El principio del método se demuestra bien en la determinación de polisacáridos amiláceos por degradación de los mismos a D-glucosa con amiloglucosidasa (Lee y Whelan, 1966; Marshall y Whelan, 1970). La D-glucosa liberada por acción enzimática se determina usando D-glucosa oxidasa (Lloyd y Whelan, 1969).

Es importante que la amiloglucosidasa usada contenga impurezas que son esenciales para el procedimiento. Marshall y Whelan observaron que la amiloglucosidasa cristalina de Rhizopus niveus, libre de alfa amilasa, no proporciona hidrolizados

cuantitativos. Se puede ver en la Tabla 6 el grado de conversión de una serie de muestras de glucógeno y almidón a D-glucosa, con diferentes muestras de amiloglucosidasa. La proveniente de Aspergillus niger contiene alfa amilasa.

Este método es aplicable a cualquier polisacárido siempre que se pueda encontrar una enzima o mezcla de enzimas adecuadas para llevar a cabo la conversión. Se intentó desarrollar un método para beta glucanos solubles usando preparaciones enzimáticas de emulsina de almendras pero sin éxito debido a la reversión enzimática. Sin embargo es probable que se pueda mejorar el método realizándolo en presencia de D-glucosa oxidasa, de manera tal que la glucosa liberada se oxide inmediatamente, evitando la síntesis de oligosacáridos.

2.- Determinación enzimática de los productos de oxidación con IO_4^- y degradación de Smith

Las reacciones involucradas en la degradación de Smith dan alditoles. Se desarrollaron métodos enzimáticos para la determinación de dos de los alditoles más comúnmente encontrados: glicerol (Noble y Sturgeon, 1970) y eritritol (Sturgeon, 1971)

La ventaja de estos métodos es su gran sensibilidad pues se pueden estimar 0.1 micromoles del alditol. La medición se puede realizar directamente sobre la mezcla de reacción luego de la degradación de Smith. Para ambos alditoles el método depende de la acción de quinasas específicas, eritritol quinasa (EK) y glicerol quinasa (GK) que fosforilan específicamente al alditol respectivo. Ambas reacciones se acoplan con otras acciones enzimáticas que involucran un cambio en el estado de oxidación de nicotinamida adenina dinucleótido, presente como cofactor. Se mide el cambio de absorción en UV a 340 nm. La secuencia de reacciones involucradas se observa en el esquema 4.

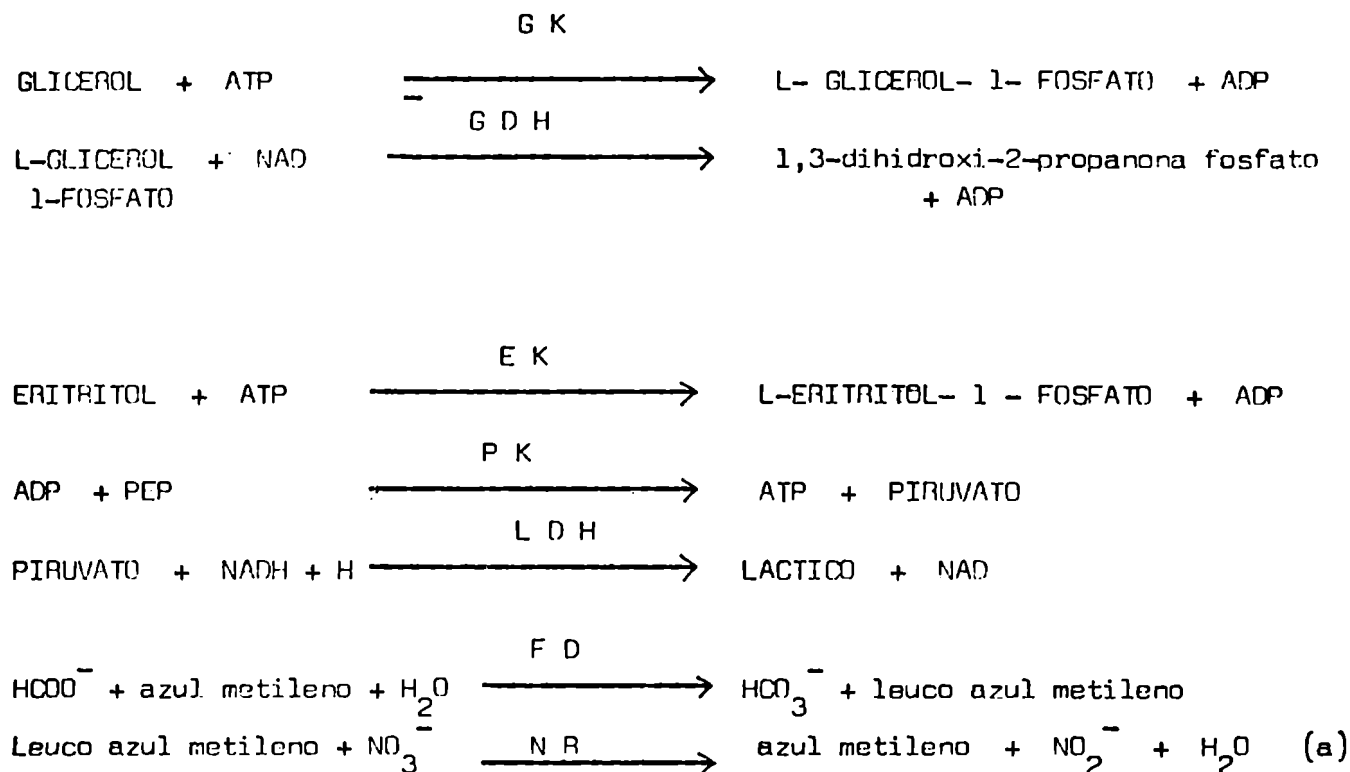
El ácido fórmico que se produce durante la oxidación con IO_4^- se puede estimar también por procedimientos enzimáticos (Esquema 4)

TABLA 6D- GLUCOSA LIBERADA ENZIMATICAMENTE DE MUESTRAS DE ALMIDON Y GLUCOGENO

Sustrato	Glucoamilasa proveniente de		
	<u>Aspergillus</u> <u>niger</u>	<u>Rhizopus</u> <u>niveus</u>	<u>Rhizopus niveus</u> más alfa amilasa
Amilosa de papa	97.0	90.1	101.0
Almidón de maiz	100.0	97.6	103.0
Dextrina beta límite de almidón de maiz	97.7	91.1	100.0
Almidón (Floridean)	90.8	77.8	97.0
Glucógeno de ostras	99.2	98.1	99.3
Glucógeno de hígado de conejo	98.9	98.4	100.0
Glucógeno de músculo	96.3	87.8	99.4

ESQUEMA 4

SECUENCIA DE REACCIONES INVOLUCRADAS EN LA DETERMINACION
ENZIMATICA DE ALDITOL Y ACIDO FORMICO



ATP: adenosina-5'-trifosfato

ADP: adenosina-5'-pirofosfato

PEP:fosfoenolpirúvico

GDH:alfa-glicerofosfato deshidrogenasa

GK: glicerol quinasa

EK: eritritol quinasa

PK: piruvato quinasa

LDH:láctico deshidrogenasa

FD: formiato deshidrogenasa

NR: nitrato reductasa

(a) se determina espectrofotométricamente el nitrito producido

3.- Determinación del grado de polimerización de glucanos

Se desarrolló un método para medir el grado de polimerización de glucanos (Manners, 1971). Se reduce el glucano con BH_4Na , tal que todos los extremos reductores se conviertan en D-glucitol. Luego se mide glucosa y glucitol, este último; con la enzima D-glucitol deshidrogenasa; esto va acompañado de la reducción de NAD y su determinación espectrofotométrica. Este método se podría aplicar a la estimación del grado de polimerización de otros glucanos usando la alditol deshidrogenasa apropiada.

ENZIMAS AMILOLÍTICAS

ALFA AMILASA

Sus propiedades y especificidad general están bien determinadas. Se preparó en forma cristalina de diversas fuentes: de saliva humana (Fischer, 1961); del hongo Aspergillus oryzae (Fischer, 1954), de Bacillus subtilis (Stein y Fischer, 1961), páncreas porcino, etc. Estas enzimas generalmente están libres de toda otra carbohidrasa, aun cuando se ha notado ocasionalmente la presencia de maltasa.

Las alfa amilasas hidrolizan al azar las uniones glucosídicas alfa-D-(1→4) en polisacáridos tipo almidón. El producto final a altas concentraciones de enzima es D-glucosa y maltosa junto con una serie de dextrinas alfa límite. Estas dextrinas son oligosacáridos de grado de polimerización 4 ó más, que contienen las uniones alfa-D-(1→6) glucosídicas que constituyen los puntos de ramificación en el sustrato. Así como estas uniones son resistentes a la hidrólisis con alfa amilasa, estabilizan algunas de las uniones alfa-D-(1→4) vecinas. Por ello no se produce isomaltosa por acción de alfa amilasa. Algunos informaron su presencia en hidrolizados obtenidos con esta enzima (Montgomery y col, 1949) pero probablemente se deba a alguna transferasa presente en los preparados usados.

Los oligosacáridos más pequeños obtenidos por alfa amilólisis del almidón son los que se ven en la Figura 8.

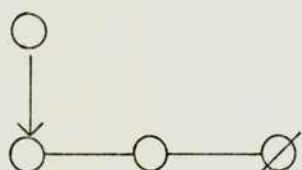
A pesar de que el ataque amilolítico con alfa amilasa es al azar, el modo de acción particular depende del origen de la enzima.

Todas las alfa amilasas requieren Ca^{++} para estabilizarse, activarse o ambas cosas. Son estables a pH entre 5.5 y 8 y el pH óptimo de actividad está alrededor de 6. Los iones de metales pesados: Hg, Cu y Pb inhiben su acción por un mecanismo aún no conocido.

Los resultados obtenidos con experimentos realizados con H_2^{18}O y la retención de la configuración en C_1 de la D-glucosa, sugirieron dos mecanismos de acción:

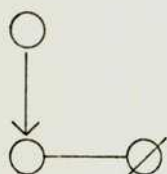
FIGURA 8

OLIGOSACARIDOS MAS PEQUEÑOS OBTENIDOS CON ALFA AMILASA



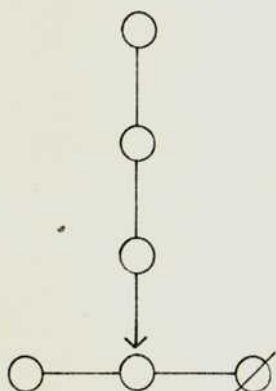
6^3 - glucosil maltotriosa

Con alfa amilasa humana y de
Aspergillus oryzae



6^2 - glucosil maltosa

Con alfa amilasa de malta



6^2 - maltotriosil maltotriosa

Con alfa amilasa de *Bacillus subtilis*

- a) Un desplazamiento frontal (S_{N2}) (Thoma y col, 1963) en el cual las uniones $C_1 - O - C_4$ se rompen simultáneamente formando una unión nueva OH
- b) Un doble desplazamiento que involucra dos S_{N2} , la unión $C_1 - O - C_4$ se abre y se forma el complejo enzima sustrato que luego se rompe para dar lugar a los productos

En el Esquema 5 se pueden ver ambos mecanismos.

BETA AMILASA

Se la encuentra en plantas superiores y se la preparó en forma cristalina de granos de soja y trigo (Meyer, 1953), cebada y batata (Balls, 1948). La enzima proveniente de cereales está contaminada generalmente con trazas de alfa amilasa (Peat y Whelan, 1952), debiendo probarse siempre la actividad de esta carbohidrasa usando, por ejemplo, la amilosa oxidada descripta anteriormente. La beta amilasa de batata contiene maltasa. Su actividad se suprimió originalmente agregando Tris o eritritol, pero actualmente se ha desarrollado un método para eliminar totalmente dicha impureza (Marshall y Whelan, 1973).

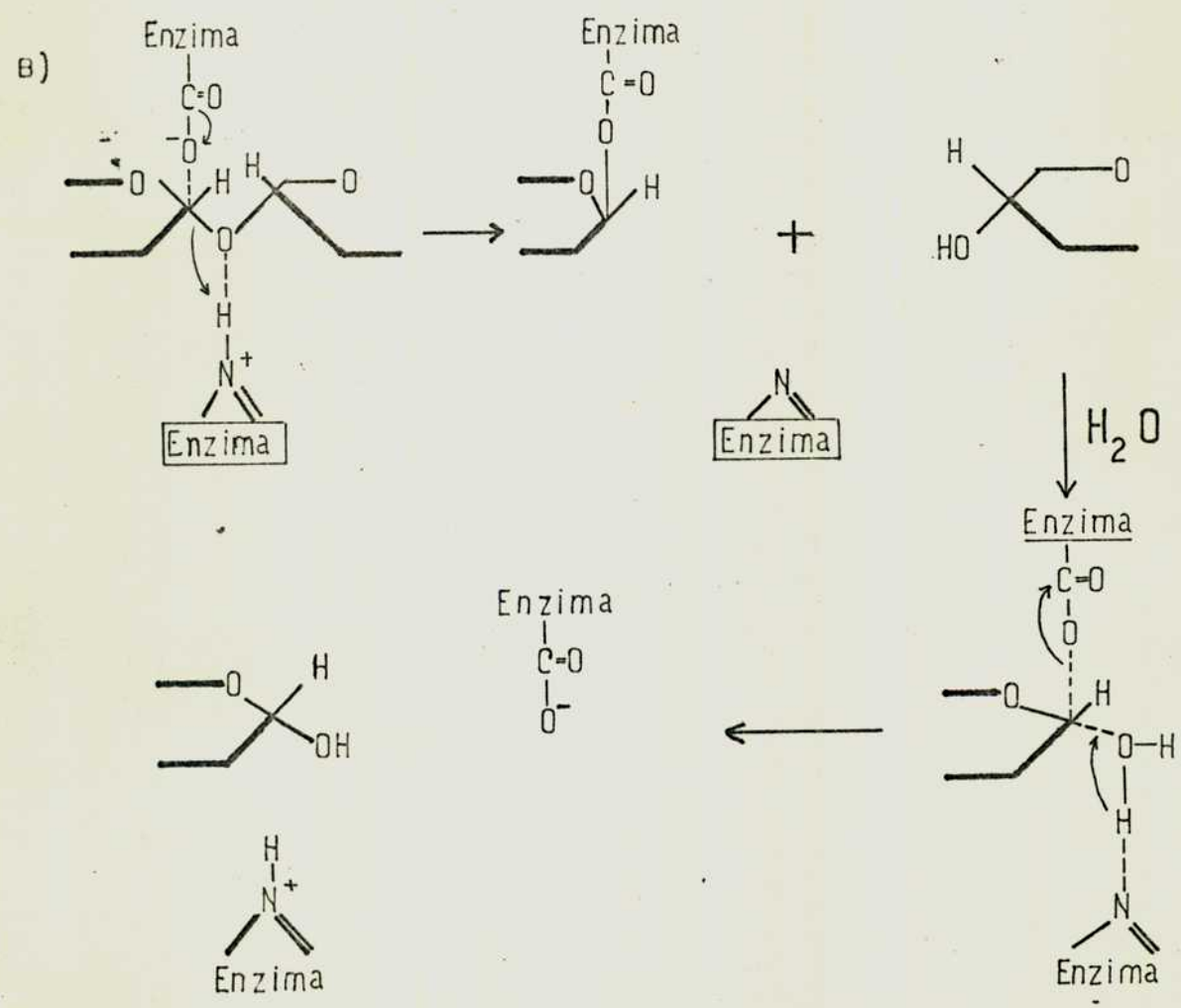
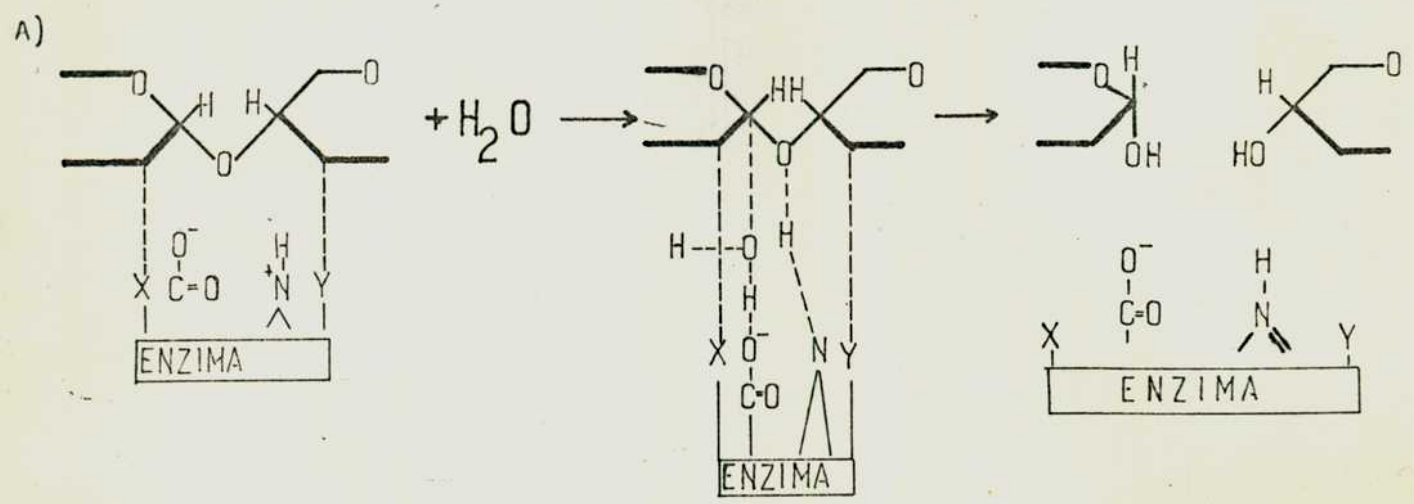
La beta amilasa libera maltosa de a pasos desde el extremo no reductor de un alfa-D-(1→4) glucano. Una cadena lineal con número par de residuos de glucosa se convierte totalmente en beta maltosa mientras que aquellas con número impar de residuos dan además maltotriosa que es posteriormente hidrolizada a glucosa y maltosa. En esto se basa un método desarrollado por Banks y Greenwood en 1968 para determinar el grado de polimerización de maltodextrinas lineales y amilosa donde miden con glucosa oxidasa la glucosa formada

$$\text{Grado de polimerización} = \frac{\text{mg de polisacárido (como glucosa)}}{2 \times \text{glucosa liberada con beta amilasa}}$$

La acción de la enzima en polisacáridos ramificados (amilopectina y glucógeno) se detiene en la región de las uniones alfa-D-(1→6). La diferente proporción de estas uniones da lugar a distintos grados de hidrólisis (Tabla 7).

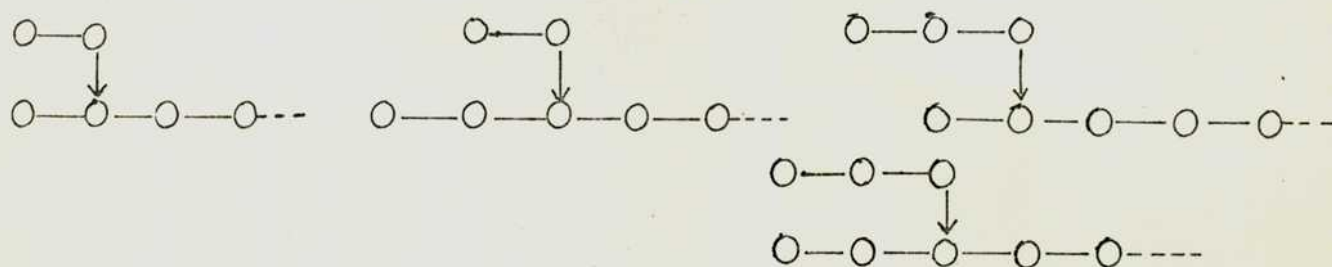
ESQUEMA 5

MECANISMOS PROPUESTOS PARA LA ACCION DE ALFA AMILASA



Las cadenas laterales se cortan dejando residuos alfa-D-(1→6) maltosilos o maltotriosilos según las mismas contengan un número par o impar de glucosas (Summer y French, 1956). No se produce isomaltosa.

Respecto de su acción en la cadena principal, ha sido objeto de muchas controversias y las conclusiones corrientes son que se detiene a uno o dos residuos de D-glucosa desde el punto de ramificación, tal que las estructuras que pueden quedar son:



Las preparaciones comerciales de esta enzima pierden rápidamente actividad, particularmente en soluciones diluidas. Por ello se agrega glutatión o albúmina sérica humana para estabilizarla. La beta amilasa no requiere iones metálicos u otros cofactores. El Ph óptimo de actividad está entre 5 y 6.

Un problema que se encuentra a menudo cuando se realizan beta amilólisis en gran escala, es la inhibición que provoca la maltosa sobre la enzima (Misra y French 1960). En esos casos, para asegurar una hidrólisis total, se hace una degradación inicial con la enzima para liberar la mayor parte de la maltosa de las cadenas exteriores, la cual se elimina por diálisis. El producto dializado se reincuba hasta degradación total (Whelan, 1964). También se puede realizar la incubación dentro de una bolsa de diálisis, eliminando así continuamente el producto de bajo Peso Molecular

Respecto del mecanismo de acción de la beta amilasa, los experimentos realizados con $H_2^{18}O$ demostraron que la maltosa liberada tenía ^{18}O en el átomo de C anomérico. Este resultado indica que esta enzima, así como la alfa amilasa, rompe la unión $C_1 - O - C_4$, entre C_1 y el átomo de oxígeno.

AMILOGLUCOSIDASA

Es una enzima microbiana producida por especies de Aspergillus (Lineback, 1970) ; Rhizopus (Pazur, 1967); Endomyces (Fukui, 1969) y otros. Actúa sobre polisacáridos amiláceos liberando moléculas de beta glucosa de a pasos desde el extremo no reductor.

Su acción indica que puede hidrolizar tanto las uniones alfa-D-(1→4) como alfa-D-(1→6) glucosídicas aunque hay quienes opinan que las enzimas aisladas consisten en realidad en una mezcla de ellas.

Generalmente tiene alfa amilasa como impureza. Aunque este contaminante es útil cuando la enzima se usa para determinaciones cuantitativas en polisacáridos amiláceos, provoca resultados erróneos cuando se la utiliza para estudios estructurales.

El principal inconveniente asociado con el uso de la amiloglucosidasa es la formación de productos de reversión tal como fue informado por Watanabe y col en 1969, particularmente isomaltosa; por ello se debe tener mucho cuidado cuando se interpretan los resultados.

La enzima es altamente estable y no requiere ningún cofactor (Pazur, 1970).

PULULANASA

Es una enzima extracelular aislada por primera vez por Bender y Wallenfels en 1961 de Aerobacter aerogenes. Se la obtiene pura haciendo crecer el microorganismo bajo condiciones en que la enzima permanece unida a la célula, seguida de su extracción con detergentes (Wallenfels, 1966).

Hidroliza las uniones alfa-D-(1→6) de amilopectina y glucógeno. En el caso de la primera la desramifica totalmente (95%) de manera tal que el límite de beta amilólisis asciende de 48% a 92% después del tratamiento con pululanasa. Hidroliza cuantitativamente el pululano a maltotriosa. Su acción en este caso es del tipo endo, tal que se aíslan polímeros de alfa maltotriosa unidos a través del oxígeno del C-6

Sin embargo su modo de acción sobre polisacáridos ramificados parece ser del tipo exo.

La acción conjunta de pululanasa y beta amilasa sobre polisacáridos ramificados produce hidrólisis total. Esto se puede usar para estimar enzimáticamente la longitud de cadena promedio de estos polisacáridos (Lee y Whelan, 1966). A altas concentraciones la acción de la pululanasa sobre la dextrina beta límite da maltosa a partir de las cadenas con número par de glucosas y maltosa más glucosa de las cadenas con número impar. Se calcula el grado de polimerización considerando una equivalencia estadística entre las cadenas pares e impares del polisacárido.

$$\text{Longitud promedio} = \frac{\text{polisacárido total (Como glucosa)}}{2 \times \text{glucosa liberada (beta amilasa más pululanasa)}}$$

La pululanasa es muy estable al calor. El tratamiento del sistema a 100° durante un corto período de tiempo no es suficiente para inactivarla.

A altas concentraciones, la pululanasa exhibe reversión y así la maltosa da dos tetrasacáridos y la maltotriosa, tres hexasacáridos (French, 1966).

En la Tabla 8 se ve su especificidad respecto de distintos polisacáridos.

R-ENZIMA

Su especificidad es muy similar a la de la pululanasa y se llegó a creer que son idénticas (E. Y. C. Lee y Whelan, 1971).

Hobson, Peat y col en 1951 la aislaron por primera vez de papa. Su purificación es bastante difícil. No desramifica totalmente la amilopectina y no actúa sobre el glucógeno (Peat y col, 1954). Hidroliza el pululano de la misma manera que la pululanasa (Drummond y Whelan, 1970).

Las pequeñas diferencias de acción de la pululanasa y R-enzima en su comportamiento con glucógeno, pueden resultar simplemente de variaciones en la concentración a la cual se ensayaron sus especificidades. Ver Tabla 8.

ISOAMILASA

Aunque se conoce desde hace muchos años su existencia en levaduras (Maruo, 1951), nunca se la purificó ni caracterizó.

Kobayashi y col en Japón (1970) y Gunja Smith, Whelan y col en USA (1970) descubrieron independientemente isoamilasas en otros organismos. Cultivos filtrados de Cytophaga manifestaron tener isoamilasa libre de cualquier otra enzima degradativa. El grupo japonés la obtuvo de una especie no identificada de Pseudomonas.

No es estable al calor. No requiere cofactores.

Desramifica totalmente glucógenos, amilopectinas y sus dextrinas fosforilasa límite. Sin embargo su acción sobre las dextrinas beta límite de glucógenos y amilopectinas es incompleta. Este comportamiento se debe a su incapacidad para hidrolizar cadenas laterales de dos residuos de D-glucosa, lo cual se demostró que es una de las propiedades más útiles de esta enzima. Otro de sus requerimientos, es que las uniones alfa-D-(1→6) glucosídicas hidrolizadas se encuentren sobre un verdadero punto de ramificación. La enzima no actúa sobre el pululano.

En la Fig 9 se comparan los requerimientos mínimos de especificidad de la isoamilasa y pululanasa.

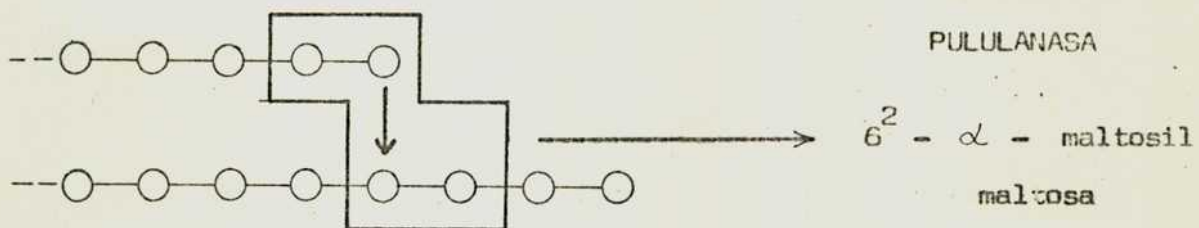
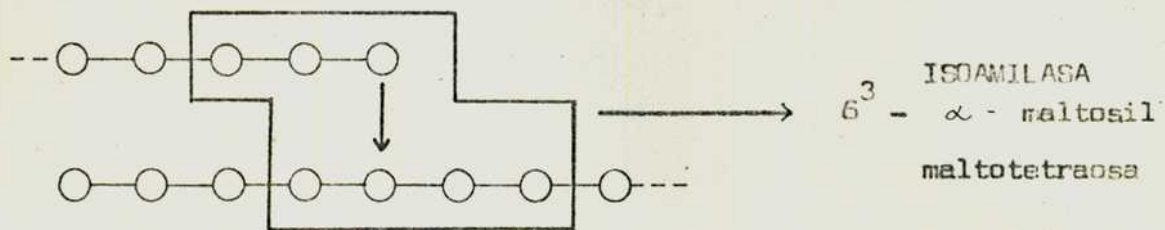
GLUCOSIDASA TRANSFERASA .- Amilo(1→6) glucosidasa

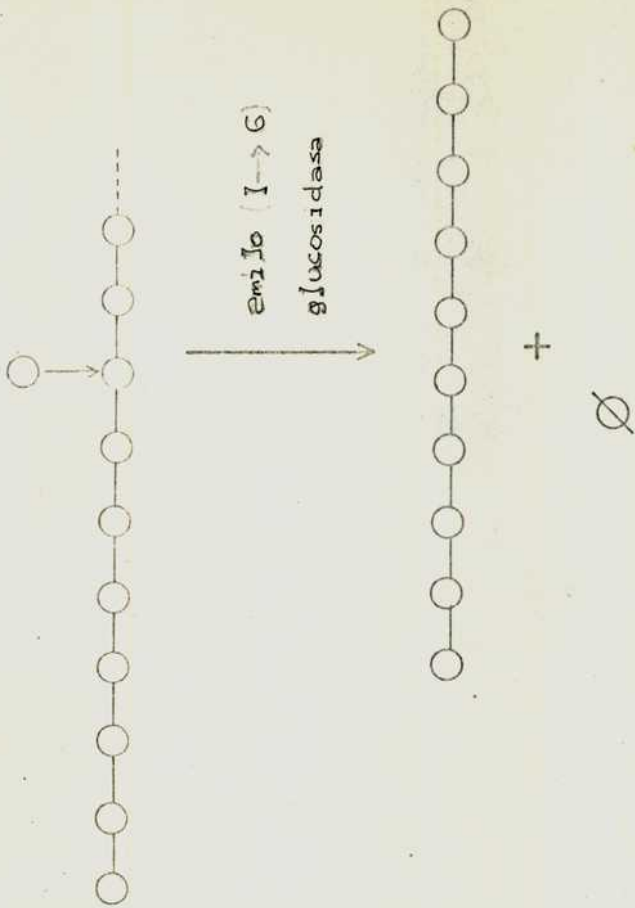
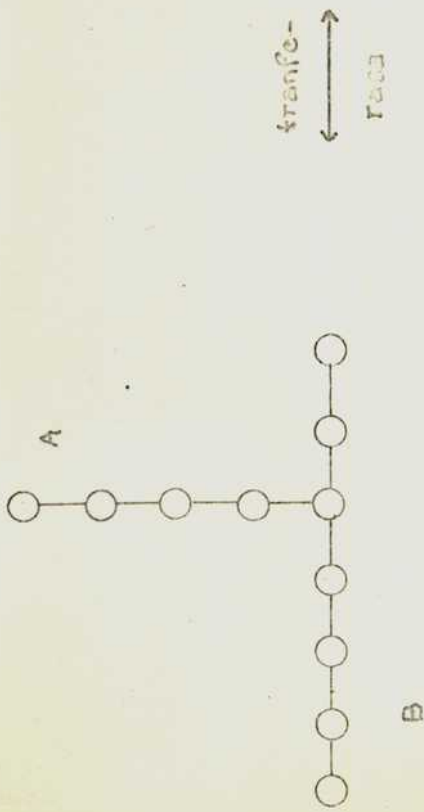
Mucho después de su descubrimiento por Cori en 1951, se observó que es un complejo binario con un componente hidrolítico que extrae los residuos de alfa-D-(1→6) glucosas unidos a cadenas de alfa-D-(1→4) glucanos. El otro componente es una alfa-D-(1→4) glucantransferasa que en muchos casos está involucrada en el proceso de desramificación (Abdullah y Whelan, 1963).

Las cadenas laterales de tres ó más residuos de glucosa (longitud óptima 4) se acortan a un solo residuo por acción de la transferasa. La D-glucosa expuesta se hidroliza con el componente hidrolítico del sistema (Esquema 6).

FIGURA 9

ESPECIFICIDADES DE PULULANASA E ISOAMILASA





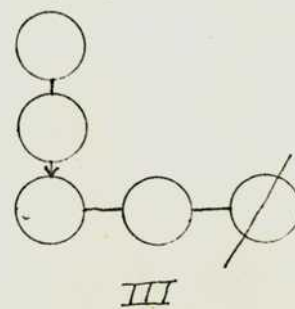
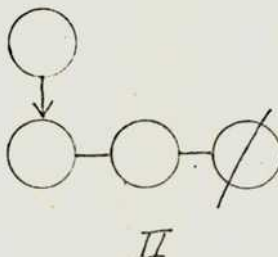
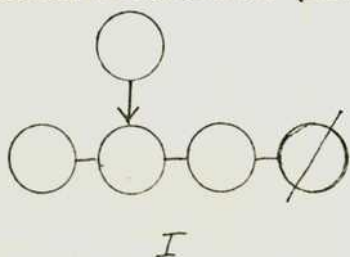
ESQUEMA 6

MODO DE ACCION DE LA GLUCOSIDASA - TRANSFERASA

El complejo enzimático se aisló de músculo de conejo, pero luego se encontró en varias fuentes, incluyendo levaduras (Lee, 1970). No parece requerir cofactores y se puede inactivar cada uno de sus componentes selectivamente. En presencia de molibdato no actúa la transferasa.

Es probable que en vivo este sistema actúe junto con la fosforilasa en la utilización del glucógeno.

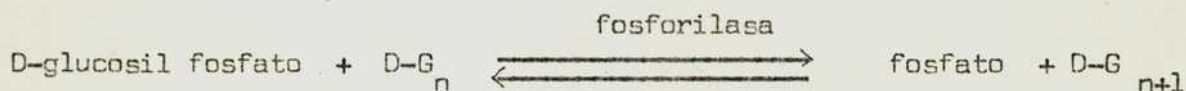
El sustrato menor sobre el que actúa esta enzima es 6³-alfa-D-glucosilmaltotetraosa (I). No hay acción sobre 6³-alfa-D-glucosilmaltotriosa (II) o 6³-alfa-D-maltosilmaltotriosa (III)



FOSFORILASA

Se la preparó de plantas, microorganismos y mamíferos.

Actúa sobre polisacáridos amiláceos liberando residuos de D-glucosa por un mecanismo exo, como D-glucosil fosfato, desde los extremos no reductores.



Esta reacción es reversible y entonces es necesario tener gran exceso de ortofosfato inorgánico para asegurar degradación completa.

La enzima es útil para examinar polisacáridos ramificados que dan una dextrina límite (dextrina β). Su acción como la de la beta amilasa se detiene en la región de las ramificaciones. Su especificidad es tal que al llegar al límite de hidrólisis quedan cuatro residuos de glucosa en cada cadena, sobre los que actúa la glucosidasa transferasa que como vimos tiene este requisito estructural.

Si la reacción se lleva a cabo en presencia de arseniato en lugar de fosfato, la degradación de los alfa-D-glucanos da D-glucosa en lugar de D-glucosil fosfato (Katz, 1961). Se considera que forma inicialmente D-glucosil arseniato que es lábil y se hidroliza rápidamente.

ISOPULULANASA

Sakano y Kobayashi en Japón (1971) buscando pululanasa en Aspergillus niger, encontraron una enzima cuya acción sobre el pululano era distinta de la esperada. Se la llamó isopululanasa o pululano-4-glucanohidrolasa y su acción es tal que hidroliza las uniones alfa-D-(1→4) glucosídicas del pululano para dar isopanosa (6¹-alfa-D-maltosilglucosa) como residuo. También actúa sobre panosa, 6³-alfa-D-glucosilmaltotriosa y 5²-alfa-D-maltosilmaltotriosa (Fig 10)

Esto sugiere que la enzima hidroliza selectivamente las uniones alfa-D-(1→4) glucosídicas del residuo que lleva un sustituyente en O-6 (Fig 10).

Se propuso un mecanismo de tipo endo y con ataque libre, pero esto no está aún debidamente estudiado (Sakano y Kobayashi, 1972).

ENZIMAS NO AMILOLITICAS

Las enzimas de este tipo que se conocen actualmente son numerosas y se siguen buscando otras tal que sea posibles estudiar glucanos con cualquier tipo de unión. Entre las más utilizadas mencionaremos

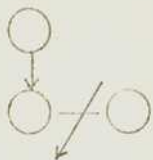
a) DEXTRANASAS: hidrolizan uniones 1→6 de dextranos. Se aislaron de microorganismos (Hutson y col, 1963). Son endoenzimas.

b) BETA - D - (1→3) GLUCANASAS: entre las que se distinguen varios tipos de acuerdo con su especificidad

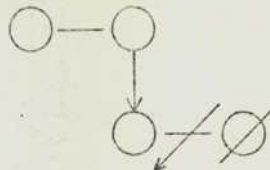
i) Específicas: se aislaron de plantas y microorganismos (Manners, 1973). Actúan solamente en uniones beta-D- (1→3)

ii) No específicas: presentes en Cytophaga. Degradan al laminarano dando glucosa y laminaribiosa (Marshall, 1973). Se une a las uniones beta-D-(1→3) glucosídicas, pero hidroliza también las beta-D-(1→4) vecinas.

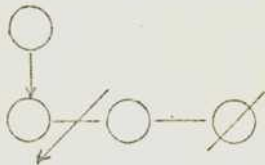
OLIGOSACARIDOS SOBRE LOS QUE ACTUA LA ISOPULULANASA



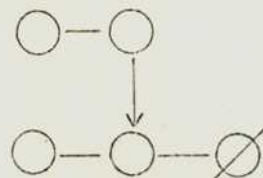
PANOSA



6^2 - alfa - maltosil maltosa



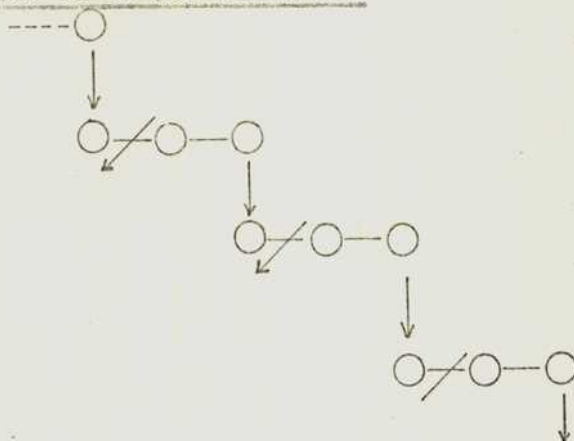
6^3 - alfa - glucosil maltotriosa



6^2 - alfa - maltosil
maltotriosa

Taguchi y Kobayashi (1973)

MODO DE ACCION DE LA ISOPULULANASA



Sakano y Kobayashi (1972)

FIGURA 10

- iii) Exo glucanases: obtenidas de algas: Euglena gracilis. Actúan sobre oligosacáridos y polisacáridos con uniones beta-D-(1→3) liberando glucosa desde el extremo no reductor (Valton y col, 1962)
- iv) Liquenasa: solo actúa sobre los glucanos con uniones mixtas como el liquenano, siendo el producto principal el trisacárido D-beta-D-Glp-(1→4)-beta-D-Glp-(1→3)-D-Glp (Reese y Berlin, 1963).
- c) BETA - D - (1→6) GLUCANASAS: se encontraron en hongos (Ricks y col, 1962). No se conoce su especificidad, pero se sabe que el mecanismo de acción es endo.
- d) BETA - D - (1→4) - GLUCANASAS: muchas de ellas proveniente de hongos han sido purificadas. No son altamente específicas y algunas inclusive degradan beta-D-(1→4) xilanos y glucomananos (Bishop y col, 1965)

TABLA 2

ACCION ENZIMATICA SOBRE POLISACARIDOS AMILACEOS

Enzima	Degradación expresada como	% de degradación :		
		Amilosa	Amilopectina	Glucógeno
alfa amilasa	maltosa	110-120	85-95	75-85
beta amilasa	maltosa	70-80	50-60	40-50
fosforilasa	alfa-D-glucosil fosfato	70	35-45	20-30
pululanasa	glucosa	+ (a)	4-5	0
isoamilasa	glucosa	+ (a)	4-5	7-10
beta amilasa + pululanasa (usadas conjuntamente)	maltosa	95-100	100	100
beta amilasa + pululanasa (usadas sucesivamente)	maltosa	85-100	95-100	40-50
beta amilasa + isoamilasa (usadas sucesivamente)	maltosa	90-100	100-105	105-110
glucoamilasa con trazas de alfa amilasa	glucosa	100	100	100
glucoamilasa pura de <u>Aspergillus niger</u>	glucosa	nd	65-75	40-50

(a) ocurre hidrólisis pero la acción se ve indirectamente, por ejemplo en el aumento del límite de beta amilólisis

nd: no determinado

TABLA 8

ESPECIFICIDAD DE ENZIMAS DESRAMIFICANTES

Sustrato	R-enzima	Pululanasa	Isoamilasa	glucosidasa transferasa
Amilopectina	+	+	+	+
Glucógeno	-	-	-	+
Ø dextrina de amilopectina	nd	+	+	+
Ø dextrina de glucógeno	nd	+	+	+
beta dextrina de amilopectina	+	+	+	+
beta dextrina de glucógeno	+	+	-	-

+ este símbolo indica que el polisacárido es hidrolizado por la enzima
desramificante

nd indica no determinado

CAPITULO IV

ALFA , ALFA - D - TREHALOSA

ACIDO D - ARABINO HEXULOSONICO

α , α - D - TREHALOSA

INTRODUCCION

Trehalosa es el nombre generalmente usado para D-glucósidos-D-glucosídicos, de los cuales se conocen tres formas piranósicas. En general la α , α -D-trehalosa (alfa-D-glucopiranosil-alfa-D-glucopiranososa), es el isómero más comunmente encontrado en la naturaleza. Se la ha aislado de algas, bacterias, hongos, insectos, invertebrados, así como de algunas plantas vasculares menores. En algunos mamíferos están presente algunas de las enzimas involucradas en la síntesis y degradación de este azúcar, aunque nunca ha podido aislarse trehalosa de estas fuentes.

Las α , β trehalosa y β , β trehalosa se sintetizaron químicamente y, excepto en algunos pocos casos, no aparecen en la naturaleza. Los isómeros que contienen ambas formas furanósicas, o una furanósica y otra piranósica, no se conocen hasta el momento.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION

La α , α -D-trehalosa se extrae fácilmente de células de tejidos suspendiendo el material en etanol 70% e hirviendo la mezcla. El azúcar, que queda en el sobrenadante, se puede aislar por cromatografía en papel (Elbein, 1967) o se puede cristalizar directamente si su concentración es suficientemente alta. El azúcar es muy soluble en agua y etanol acuoso y cristaliza de soluciones de etanol 80% como dihidrato. Un derivado útil es el octaacetato (pf: 97-98°C ; $[\alpha]_D^{20} = +163$). La trehalosa se puede identificar también en pequeñas cantidades por el uso de una trehalasa específica combinada con glucosa oxidasa.

La α , α -D-trehalosa fue aislada primeramente del centeno por Wiggers en 1832. Desde allí se la encontró en un gran número de organismos, entre ellos, hongos y levaduras, en los cuales hay evidencias de que sirve como material de reserva.

En la Tabla 9 se puede ver su abundancia en hongos y levaduras .

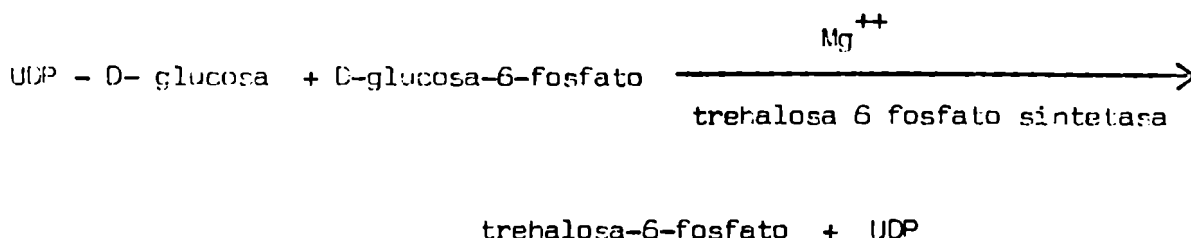
TABLA 9

ADAPTACION DE *K. C.* - LITFIALOSA EN HONGOS Y LEVADURAS

CLASE	ESPECIE	REFERENCIAS
Myxomycetes	Dictiostelium discoideum	C. Ceccarini, 1966
	Dictiostelium mucoroides	J. S. Clegg, 1961
Ascomycetes	Neurospora tetrasperma	A. Sussman, 1957
	Sacharomyces cerevisiae	K. Myrtack , 1949
Basidiomycetes	Puccinia graminis	H. Reisener, 1962
	Fomes fomentarius	O. Musgrave , 1971
	Fomes annosus	O. Musgrave, 1971
Fungi imperfecti	Pullularia pullulans	E. Merdinger, 1967
	Penicilium chrysogenum	A. Ballio, 1964
	Aspergillus luchuensis	G. Mandels, 1965
	Myrothecium verrucaria	G. Mandels, 1965
	Pitomyces chartarium	I. Andrew, 1964
	Sclerotium cepivorum	J. Coley, 1971
	Helminthosporium sativum	D. Mathre, 1969

MECANISMO DE BIOSÍNTESIS DE ALFA,ALFA - D- TREHALOSA

Cabib y Leloir (1956) demostraron el mecanismo de biosíntesis de la trehalosa en levadura de cerveza.



El equilibrio de esta reacción está bien desplazado en favor de la síntesis de trehalosa fosfato. En un paso siguiente, se elimina fosfato con una fosfatasa para dar trehalosa libre que aparentemente se almacena en grandes cantidades. Panek (1962) informó el mismo mecanismo a partir de sus estudios con levadura de panadería.

También se demostró (Eltein, 1967) que G-D-P-D- $[^{14}\text{C}]$ glucosa daba trehalosa radiactiva en extractos celulares de Strptomyces hygroscopicus.

MECANISMOS DE CONTROL

Los resultados de varios estudios indican que la biosíntesis de trehalosa está bajo cierto tipo de regulación. Elander encontró que en levaduras, la presencia de altas concentraciones de trehalosa-6-fosfato (20 mM), así como de otros azúcares fosfatados inhiben la trehalosa-6-fosfato sintetasa. En algunos organismos altas concentraciones de trehalosa (30-50 mM) inhiben la síntesis de trehalosa-6-fosfato probablemente por un mecanismo de retroalimentación. El hecho que se necesiten altas concentraciones de trehalosa (o trehalosa-6-fosfato) para la inhibición, no es sorprendente ya que la trehalosa sirve como material de reserva de energía en estos organismos y por lo tanto es almacenada en grandes cantidades.

CATABOLISMO DE ALFA,ALFA TREHALOSA

1.- α, α trehalosa - 6 - fosfato fosfatasa

Vimos que la trehalosa se sintetiza como su éster fosfórico en carbono 6, aunque generalmente se encuentra como azúcar libre. Debe existir, entonces, en los organismos que almacenan este azúcar, una fosfatasa capaz de romper la unión 6-fosfato.

Se detectó su presencia en muy pocos organismos. Cabib y Leloir la aislaron en sus estudios con levaduras y fue purificada por Friedman en 1966. Se vio que la enzima requiere la presencia de un catión divalente (Mg^{++} es el mejor), siendo el pH óptimo de acción 7.0.

2.- Trehalasa

La trehalasa (α, α -trehalosa 1-D-glucosidrolasa) fue encontrada en hongos en 1893. Desde ese momento se la encontró en una gran variedad de organismos diferentes, incluyendo algunos que no sintetizan ni almacenan trehalosa.

Las propiedades de la enzima aislada de distintos organismos varían enormemente: el pH óptimo puede estar entre 3.7 y 7.5. Algunas son solubles y otras no lo son. Es de suponer que estas propiedades reflejan los diferentes roles que la enzima cumple en el metabolismo de los organismos.

La trehalasa de levaduras es inhibida por D-glucosa y trehalosa-6-fosfato (Esta última actúa por un mecanismo competitivo).

3.- α, α -trehalosa fosforilasa

Esta enzima, que señaló un nuevo camino metabólico para la trehalosa, se encontró en el alga Euglena gracilis (Marechal y Belocopitow, 1972); cataliza la ruptura fosforolítica reversible de la trehalosa dando α -D-glucosilfosfato y D-glucosa como productos. El pH óptimo de actividad para la fosforólisis es 7.0 y para la síntesis es 6.3. Con el uso de esta fosforilasa los autores pudieron preparar algunos disacáridos desconocidos hasta entonces, como 6-deoxi- α -D-glucopiranosil- α -D-glucopiranososa y α -D-xilopiranosil- α -D-glucopiranososa.

ROLES DE LA TREHALOSA EN EL METABOLISMO

1.- Como componente estructural

En Mycobacteria la trehalosa no sólo aparece como azúcar libre, sino también como componente de varios glucolípidos. Elbein y Mitchell examinando los niveles de trehalosa y glucosa en dicho organismo, encontraron que mientras el nivel de

glucógeno aumentaba a medida que disminuía el nivel de Nitrógeno en el medio, los niveles de trehalosa permanecían constante. Estos resultados sugirieron que la trehalosa libre en estas células puede ser utilizada para otros fines que los de reserva energéticos, mientras que el glucógeno se almacena principalmente como producto de reserva.

2.- Como material de reserva

Los estudios hechos en hongos y *Strptomyces* demostraron que, durante los pasos iniciales de la germinación de las esporas, se utiliza la trehalosa como fuente de energía. Estos estudios también establecieron que la actividad específica de la trehalasa aumenta más drásticamente justo antes del tiempo de metabolización de la trehalosa o durante el mismo, haciendo posible que la enzima sea responsable del inicio del catabolismo de dicho azúcar.

Se demostró en ciertos insectos que la trehalasa puede proveer la energía para el vuelo (Evans, 1957).

3.- Como intermediario de la reabsorción de D-glucosa

Se sugirió que la síntesis y degradación de trehalosa constituye un mecanismo para la reabsorción de D-glucosa en el riñón y, probablemente, en el intestino (Sacktor, 1968).

Hay algunas anomalías no explicadas en la bioquímica de la trehalosa, como la presencia de trehalasa en el suero y orina humanos. Tampoco se puede explicar su presencia en el intestino de insectos, donde la trehalosa es un componente raro.

ACIDO D-AMARANTO (1711) (1712)

En la Tesis Doctoral de A.F.Cirelli (1972) se han resumido las características principales de dicho ácido, por lo cual remitimos a dicho trabajo al lector que requiera algún dato del mismo.

CAPITULO V:

DESCRIPCION Y DISCUSION DE LOS

RESULTADOS OBTENIDOS

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DEL ACIDO D-ARABINO HEXULOSONICO

Entre los azúcares simples de un extracto acuoso de Cyttaria hariatii Fischer se encontró un producto con las mismas características cromatográficas que el ácido D-arabino hexulosónico (Tabla 10) y que daba un color rosado característico con el reactivo de p-anisidina.

La fracción que contenía el cetoácido fue aislada por cromatografía en papel. Por reducción y lactonización se obtuvieron las dos lactonas epímeras: D-glucono- 1,4-lactona y D-manono-1,4-lactona identificadas por cromatografía en papel y cgl de sus Trimetilsililéteres (Tabla 11). Una muestra de D-arabino hexulosonato de Calcio tratada en las mismas condiciones mostraba los mismos resultados. Las reacciones que tuvieron lugar se ven en el Esquema 7.

Para estimar la cantidad de ácido libre presente en el hongo, se adaptó el método de cromatografía en papel usado para azúcares reductores con clorhidrato de p-anisidina como reactivo de revelado, obteniéndose un resultado equivalente a 1% de cetoácido presente en polvo de hongo seco. No se utilizó cromatografía gas-líquido para la determinación cuantitativa, pues tanto las experiencias realizadas en nuestro laboratorio, como los datos que aparecen en literatura para otro ácido hexulosónico: L-xilo-hexulosónico (De Witt, 1971) coinciden en establecer la pobre correlación entre la concentración y la respuesta del detector para estos ácidos.

Considerando la insolubilidad del producto en metanol, cabe suponer que el cetoácido está presente como sal. Dada la fácil descomposición del ácido en agua a ebullición o en medio ácido a temperatura ambiente (Ohle y Wolter, 1930), las soluciones que lo contenían se sometieron a liofilización cuando se realizó su estimación cuantitativa.

TABLA 10

CARACTERISTICAS CROMATOGRAFICAS DEL ACIDO D-ARABINO HEXULOSONICO

Cromatografía en papel

1	2	3	4	6	R _f (solventes)	Color observado (Reactivos)			
						a	b	c	e
0.23	0.41	0.96	0.60	0.51		marrón	rosa	rosa	anaranjado

Cromatografía gas líquido

Tr (relativo a arabitol)	Columnas	
	3% QV-17	10% NPES
Tr arabitol	1.58 y 1.68	2.20
	1.00 (7')	1.00 (3')

TABLA 11

CGL DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS POR REDUCCION Y LACTONIZACION DEL ACIDO D-ARABINO

HEXULOSONICO

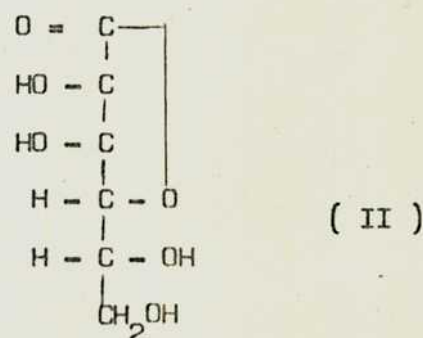
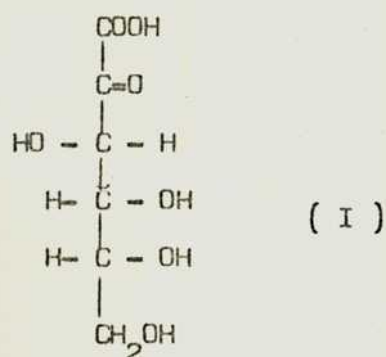
Compuesto (como TMS éter)	Tr relativo a arabitól	
	3% OV - 17 (a)	10% NPGS (b)
arabitól	1.00 (7')	1.00 (3')
D-glucono-1,4-lactona	2.02	3.60
D-manono-1,4-lactona	2.34	5.46
ácido D-arabino hexulosónico reducido y lactonizado	2.02	3.60
	2.34	5.46
cetoácido aislado de <u>Cyttaria</u> <u>harloti</u> Fischer (reducido y lactonizado)	2.02	3.60
	2.34	5.46

(a) T° inyector 290°; T° detector 320°; T° columna programada entre 120 y 200°
(4°/ min) , flujo de N₂ 30 ml/min)

(b) T° inyector 250°; T° detector 300°; T° columna 3 minutos a 150° y luego
programada entre 150-185° (10°/min), flujo de N₂ 30 ml/min

Es esta la primera vez que se encuentra un ácido hexulosónico libre en hongos. Previamente se informó su presencia como componente de un polisacárido de Cyttaria hariatii Fischer (F. Cirelli y Lederkremer, 1971) y también ha sido hallado como producto de hidrólisis de un polisacárido extraído del alga Chondrus Cripsus (Young y Rice, 1946). Estos dos son los únicos antecedentes de su aislamiento a partir de productos naturales.

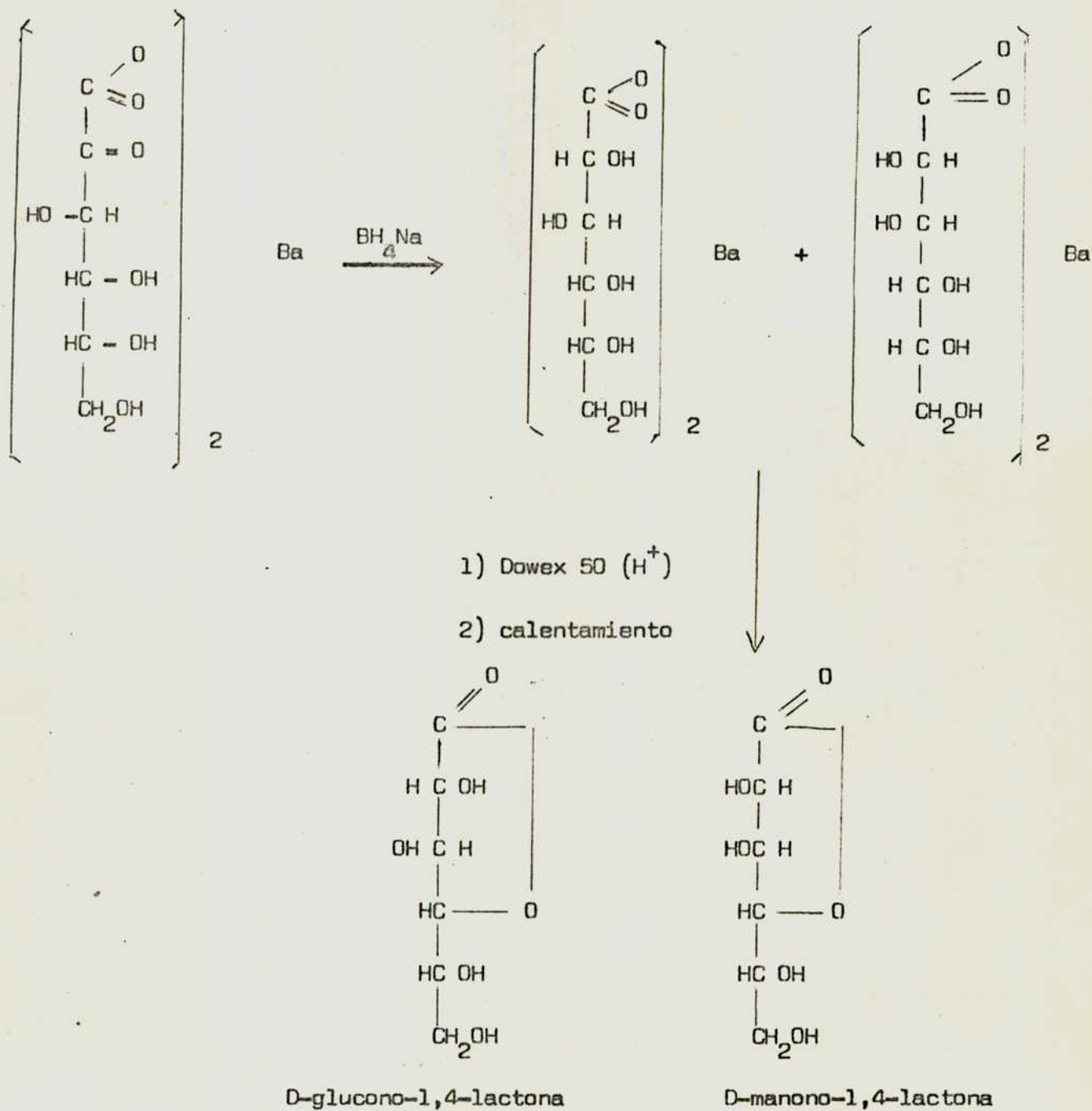
Es importante destacar que los ácidos cetoaldónicos son intermediarios de síntesis de ácidos ascórbicos. Así por lactonización y enolización simultánea del ácido D-arabino hexulosónico (I) se puede obtener ácido D-araboascórbico (II)



Kieckebusch y Lang (1962) observaron que el ácido D-arabino hexulosónico puede usarse en el tratamiento del escorbuto provocado por una dieta deficiente en Vitamina C.

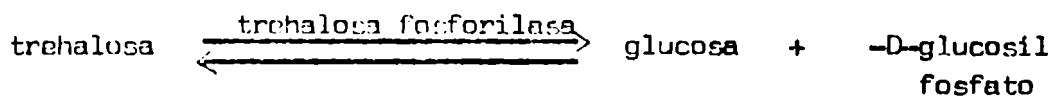
ESQUEMA 7

CARACTERIZACION DEL ACIDO D- ARABINO HEXULOSONICO



ASELAMIENTO E IDENTIFICACION DE ALFA, ALFA-D-TREHALOSA

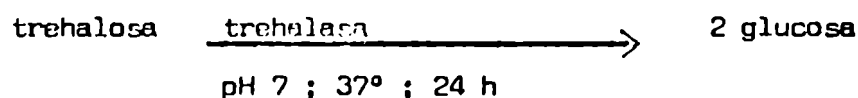
Un extracto metanólico de estromas secos de Cyttaria hariatii Fischer (previamente tratados con cloroformo, éter de petróleo) se fraccionó en una columna de celulosa. Además de los azúcares simples anteriormente estudiados (Lederkremer, 1967) se separó una fracción (5% del extracto original) que contenía un oligosacárido o mezcla de ellos de características cromatográficas similares a la alfa, alfa-D-trehalosa. La mezcla, sin embargo, contenía alguna sustancia reductora (tal como aparecía con el reactivo de -p-anisidina). Por tratamiento de esta fracción con trehalosa fosforilasa se obtenía glucosa, lo cual indicaba que uno de los componentes de la mezcla era efectivamente trehalosa, ya que la enzima cataliza específicamente la reacción:



La recristalización fraccionada con etanol proporcionó un componente puro de pf: 132-137° y $[\alpha]_D^{25} = +180$, valores coincidentes con los informados para la alfa, alfa-D-trehalosa (Reisner y col, 1962), así como con los obtenidos en el laboratorio con trehalosa comercial. El pf: 95-96° de su acetato también coincidía con el informado para el octaacetato de trehalosa: 97-99° (Hudson y col, 1915). La identidad del oligosacárido se confirmó también por el Tr en cromatografía gas líquido de su TMS éter que coincidía con el observado para el TMS éter de trehalosa.

Se estimó el porcentaje de trehalosa presente en el hongo, sobre un extracto acuoso del mismo, luego de eliminar los azúcares fermentables con Saccharomyces cerevisiae. Previamente se había demostrado que la trehalosa no experimenta ningún cambio en contacto con la levadura utilizada.

Se separó la fracción que contenía la trehalosa por cromatografía preparativa en papel de una alícuota del extracto obtenido, y tanto éste como la fracción aislada se incubaron con trehalasa (24 h , 37°) estimando, con el reactivo de glucosa-oxidasa - peroxidasa, la glucosa presente



De aquí surge que:

$$\text{mmoles de glucosa} = \text{mmoles de trehalosa} / 2$$

Paralelamente se trabajó con un testigo de trehalosa de concentración conocida y con el cual se habían seleccionado previamente las condiciones óptimas de reacción para que la conversión fuera total. Los resultados se observan en la Tabla 12

TABLA 12

DETERMINACION DE TREHALOSA POR HIDROLISIS CON TREHALASA

Muestra	glucosa (mmoles/ml)	trehalosa (mmoles/ml)	trehalosa (mmoles en extracto original)	trehalosa (mg)	%
Trehalosa 10^{-1} M	1960	980	0.098		
	1900	950	0.090		
Extracto acuoso fermentado	500	250	(en 50 ml) 0.125	42.7	0.3
Fracción T	700	350	(en 50 ml) 0.091	31.1	0.22

Los valores encontrados con la trehalosa patrón permiten decir que el error del método es de alrededor del 6%. La diferencia observada para los valores de azúcar informados sobre el extracto total y sobre la fracción aislada del mismo, puede deberse a una suma de errores. Por un lado, en el extracto total pueden existir azúcares que sean, en parte, hidrolizados por la enzima, lo cual haría elevar el porcentaje de trehalosa hallada en relación a la presente y además, la separación en papel puede introducir un error por defecto. De todos modos podemos decir que el porcentaje de trehalosa hallado en Cyttaria hariatii Fischer está entre 0.22 y 0.30% respecto del peso del hongo seco.

La proporción hallada es muy pequeña. Sin embargo, es posible que el azúcar esté presente en cantidades mayores en otros estadios de su vida vegetativa. Clegg y Filosa (1961) encontraron 7% de trehalosa en esporas de Dyctyostelium mucoroides, pero no hallaron el azúcar en otros estados de la vida de la levadura.

AISLAMIENTO Y PURIFICACION DEL POLISACARIDO

De un extraco acuoso de estromas secos de Cyttaria harioiti Fischer se obtuvieron, por precipitación fraccionada con etanol, dos fracciones. La primera, precipitada entre 0-40% de etanol, contenía un polisacárido estudiado anteriormente (A.F. Cirelli, 1971), mientras que la segunda, obtenida entre 52-57% de etanol, estaba formada por una mezcla de polisacáridos no estudiados (1.5% de rendimiento). Dicha mezcla fue separada por una repetición del proceso anterior, obteniéndose un polisacárido A entre 41-46% de etanol, con un 47% de rendimiento sobre el producto crudo, y otro B que precipitaba entre 50-63% de etanol con un 16% de rendimiento sobre producto crudo. Se trabajó el primero (polisacárido A) y se reservó el segundo (polisacárido B) para una futura investigación. No se examinaron los productos de mayor solubilidad.

El polisacárido A $[\alpha]_D^{25} = + 157^\circ$ (H_2O) se purificó por reprecipitación de su solución acuosa con etanol, alcanzando el poder rotatorio un valor de $+ 171$. La repetición del mismo procedimiento dos veces más dio un valor constante de α_D

La determinación de la curva de solubilidad en sistema alcohol agua, mostró que la misma no presentaba superficies de discontinuidad (Figura 11) y que el 95% del polisacárido precipitaba de su solución acuosa en un margen estrecho de concentración etanólica (40-44%).

La homogeneidad fue confirmada por ultracentrifugación, ya que las corridas hechas con una concentración 0.5% del polisacárido en $ClNa$ 0.1M daban un único pico simétrico aunque ancho ($S_{20,w}$ 3.1) (Figura 12).

La constancia del poder rotatorio a través de las distintas purificaciones, el análisis por ultracentrifugación y la curva de solubilidad, son evidencias de la pureza del producto en estudio, por lo cual se continuó con el examen de sus propiedades y se procedió a estudiar su estructura.

FIGURA 11

DETERMINACION DE HOMOGENEIDAD POR PRECIPITACION FRACCIONADA CON ETANOL

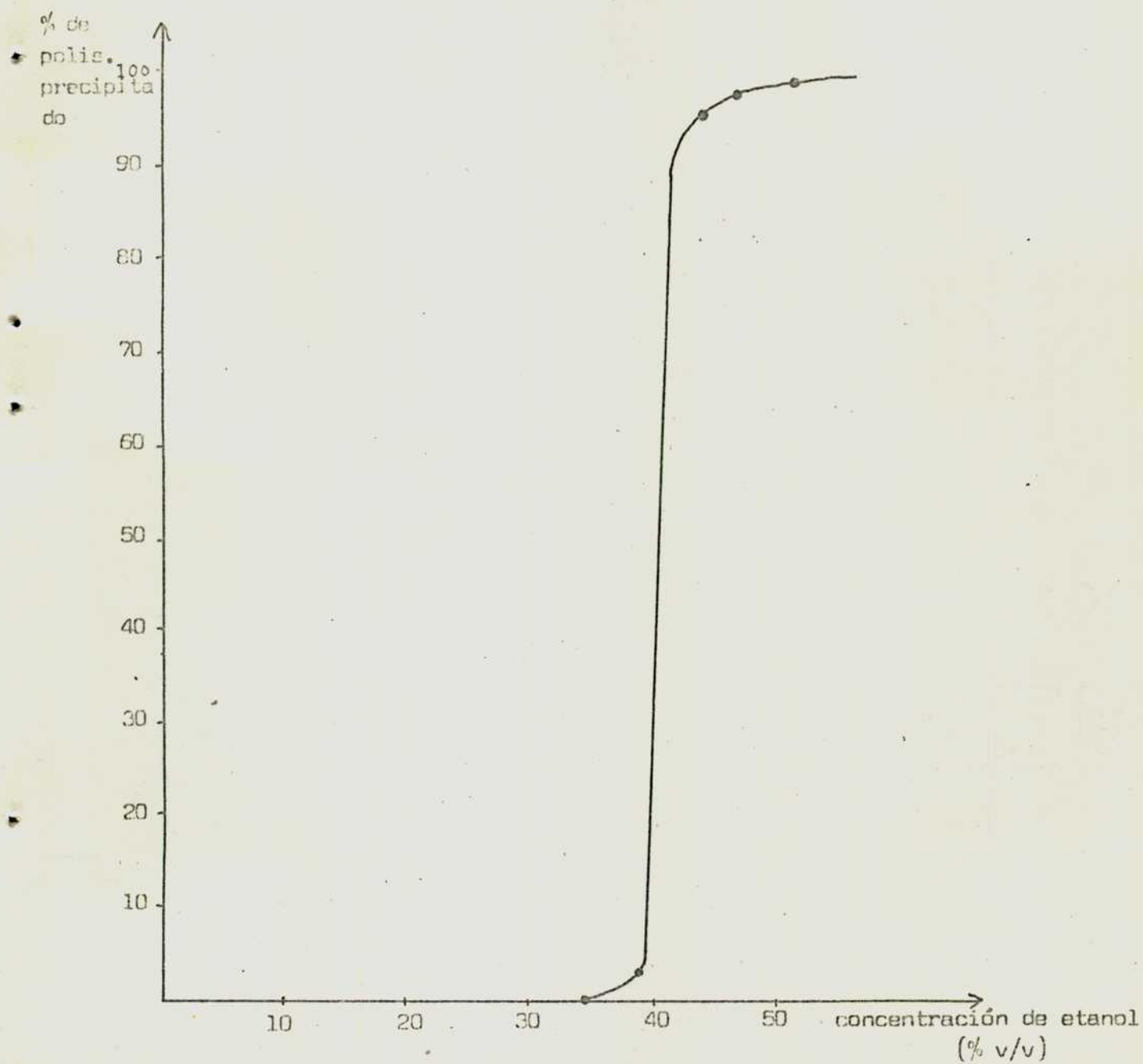
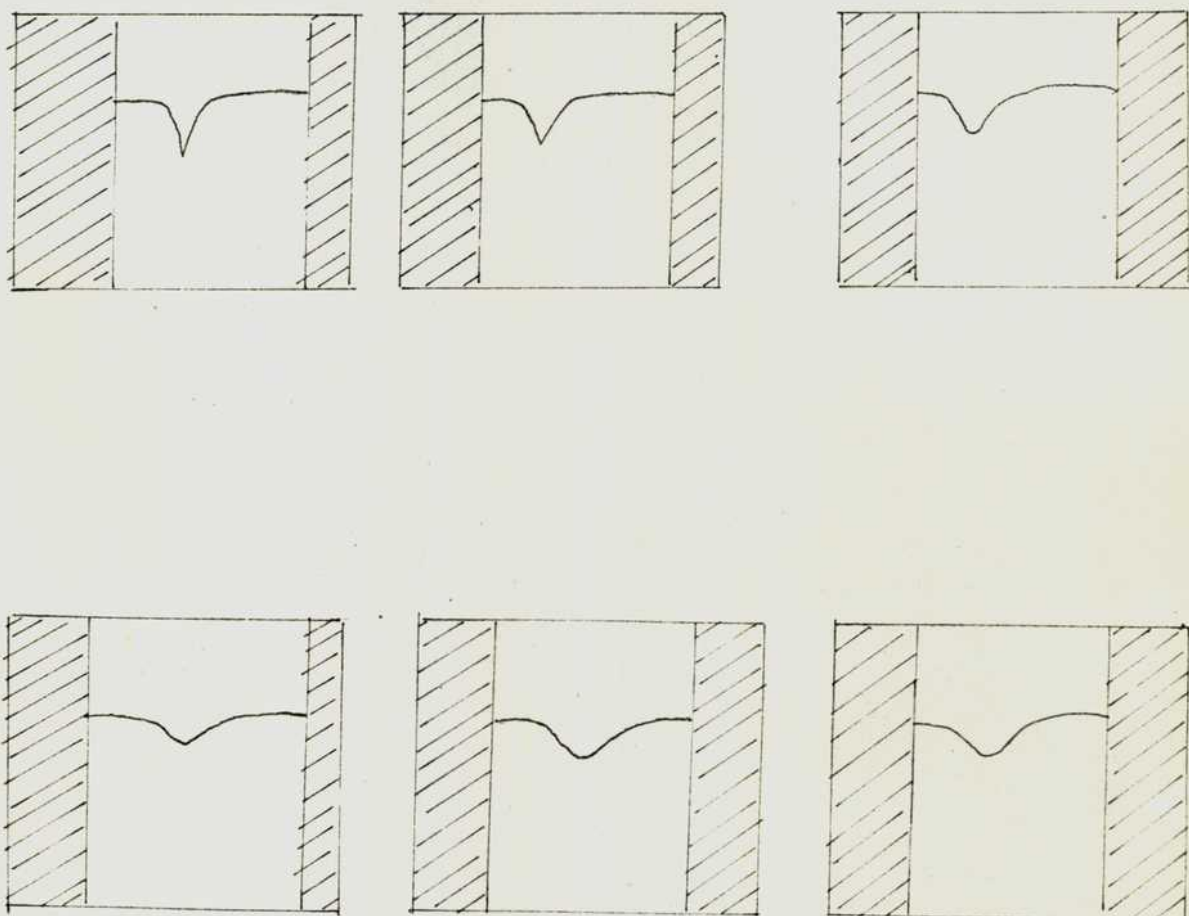


FIGURA 13

ANALISIS POR ULTRACENTRIFUGACION



Las fotos fueron tomadas a los 32 , 64 , 108 , 148 , 161 y 172 minutos

PROPIEDADES GENERALES

El polisacárido dio una leve coloración violácea por agregado de una solución de Iodo y en su espectro infrarrojo (Figura 13) se observaba una banda a 860 cm^{-1} en la zona característica de la unión alfa-D-glucosídica. No se observaba ninguna banda en las cercanías de 891 cm^{-1} , absorción indicativa de la unión beta glucosídica.

La frecuencia de la absorción en el IR junto con el alto valor de poder rotatorio, permitieron concluir que el polisacárido estaba constituido principalmente por uniones alfa-D-glucosídicas (Barber, col, 1954), teniendo en cuenta los resultados de hidrólisis ácida que se detallan más adelante.

El grado de polimerización (y por lo tanto el \overline{PM}_n) se determinaron según el método descrito por Unrau y Smith (1957), que consiste en la reducción del extremo reductor del polisacárido con BH_4Na , seguida de oxidación con periodato de sodio y medición, según el método espectrofotométrico descrito por Eegrave (1937), del formaldehído producido. En base a los datos obtenidos se calculó un grado de polimerización de 246 (\overline{PM}_n 40000) si se considera que el grupo terminal está unido a través del Oxígeno del Carbono 4 o del C-3 y por lo tanto se producen dos moles de formaldehído por mol de polisacárido; o de 123 (\overline{PM}_n 20000) si se considera que el extremo terminal está unido a través del Oxígeno del C-6 o del C-2, produciéndose en este caso un mol de formaldehído por mol de polisacárido (Figura 14).

AZUCARES COMPONENTES DEL POLISACARIDO

Por hidrólisis ácida total del polisacárido se obtuvo glucosa, caracterizada por cromatografía en papel y cromatografía gas líquido. Dicha caracterización se confirmó por preparación de la N-p-nitrofenil-D-glucopiranosilamina.

Se estimó la proporción de glucosa en el polisacárido de acuerdo al método de Lee y Whelan (1956) utilizado para analizar polisacáridos amiláceos, que consiste en hidrolizar el mismo con amiloglucosidasa y determinar la glucosa liberada

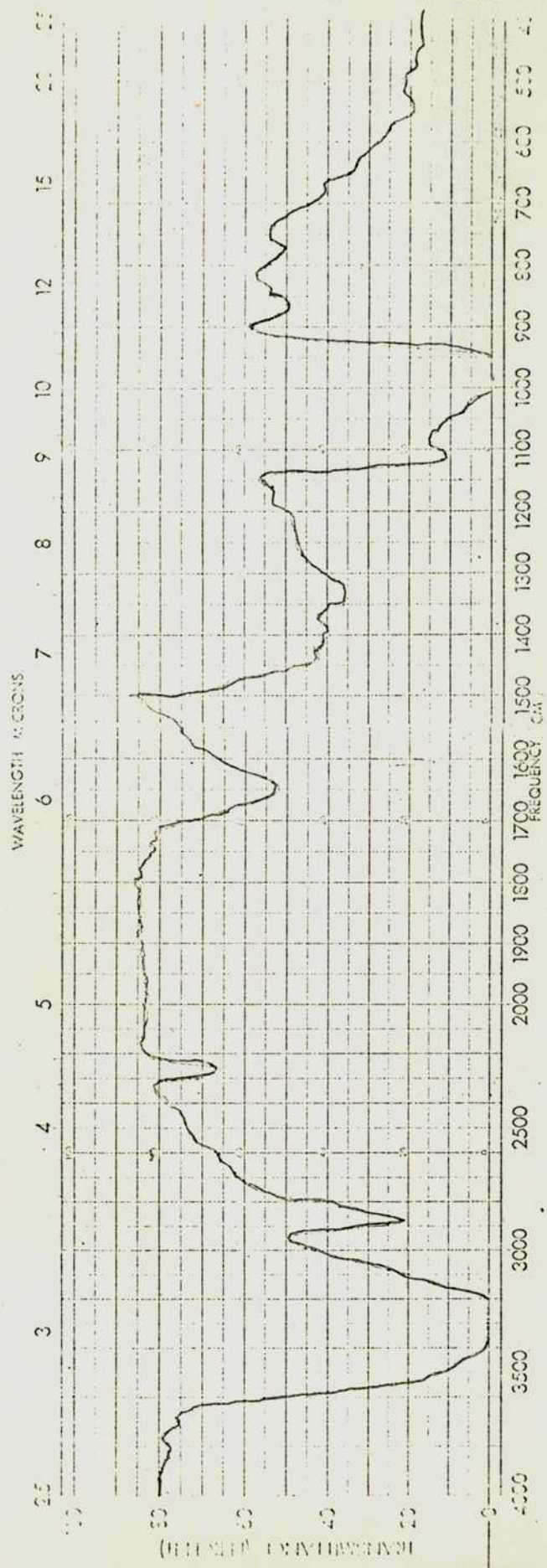
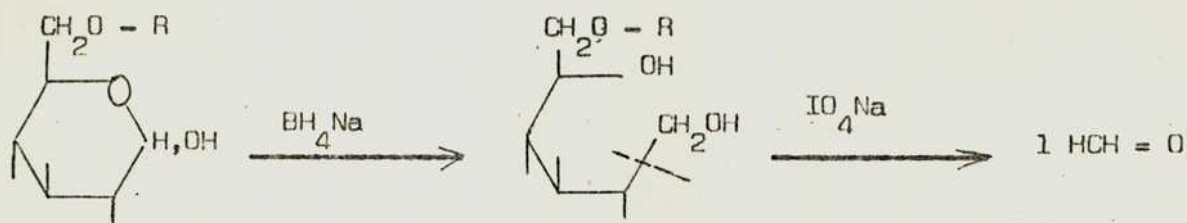
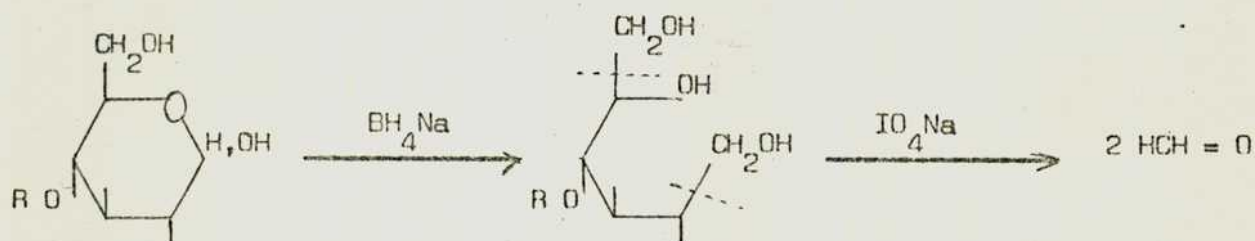
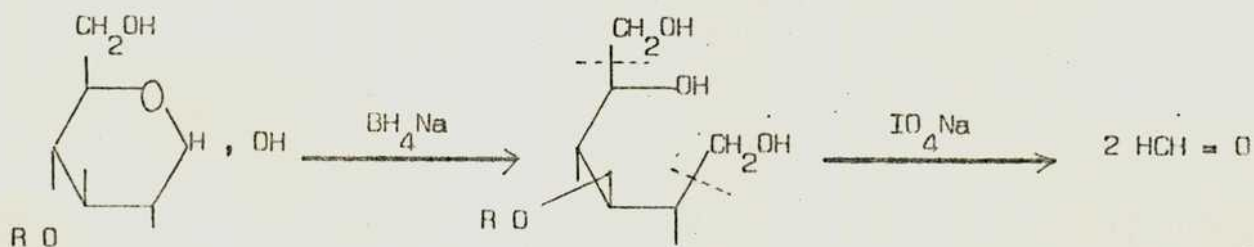
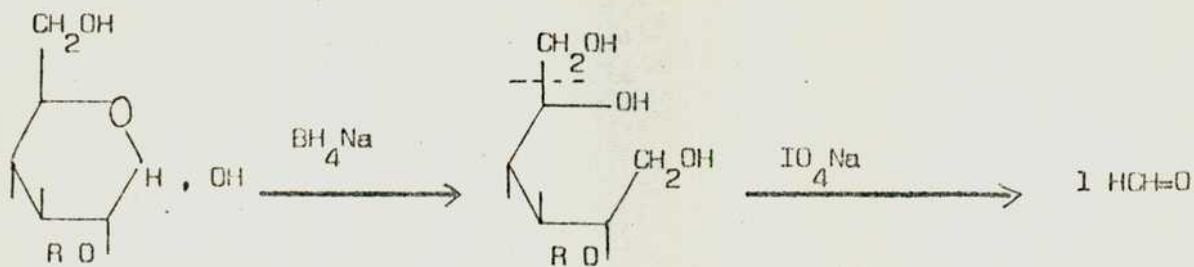


FIGURA 14

ESPECTRO INFRAROJO DEL POLISACARIDO

FIGURA 15

DETERMINACION DE EXTREMOS REDUCTORES



con el reactivo de glucosa oxidasa-peroxidasa.

Los resultados (Tabla 13) indican que después de 24h de incubación se obtuvo 102% en peso de glucosa, respecto del polisacárido original y que a las dos horas el porcentaje era de solamente 29%.

La velocidad de hidrólisis del glucano con amiloglucosidasa, permitiría excluir estructuras del tipo amiláceas pues, de acuerdo a los estudios realizados por Wallenfels y col (1964-5), el almidón experimenta un 60% de hidrólisis después de dos horas de incubación, siendo después de 7 horas la conversión casi total (Figura 15).

ESTUDIOS DE HIDROLISIS PARCIAL

Por tratamiento del glucano con ácido sulfúrico 1N durante 3 horas a 100°, se obtuvieron glucosa, 6-O-alfa-D-glucopiranosil-alfa-D-glucopiranososa (isomaltosa) y 4-O-alfa-D-glucopiranosil-alfa-D-glucopiranososa (maltosa), caracterizados por cromatografía en papel y gaseosa de los trimetilsililéteres de los oligosacáridos reducidos (Tabla 14)

Por ambos procedimientos se observó que la proporción de isomaltosa era mucho mayor que la de maltosa.

En la cromatografía en papel aparecieron oligosacáridos de menor movilidad, los cuales, según los gráficos de $\log \frac{R_f}{1-R_f}$ en función del grado de polimerización (Figura 16, Regla de French) podrían ser: O-alfa-D-glucopiranosil-(1→4)-O-alfa-D-glucopiranosil-(1→4)-O-alfa-D-glucopiranososa (maltotriosa); O-alfa-D-Glp-(1→6)-O-alfa-D-Glp-(1→4)-O-alfa-D-Glp (panosa) o bien O-alfa-D-Glp-(1→4)-O-alfa-D-Glp-(1→6)-O-alfa-D-Glp (isopanosa) y O-alfa-D-Glp-(1→6)-O-alfa-D-Glp (isomaltotriosa).

FIGURA 15

ACCION DE GLUCOAMILASA SOBRE ALMIDON Y PULULANO:

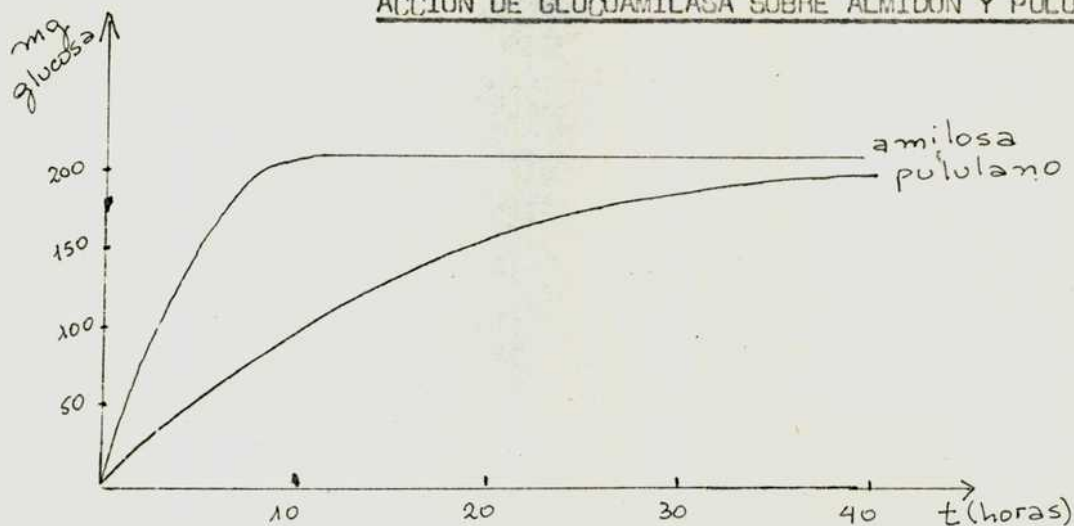


FIGURA 16

RELACION ENTRE MOVILIDAD Y GRADO

DES POLIMERIZACION

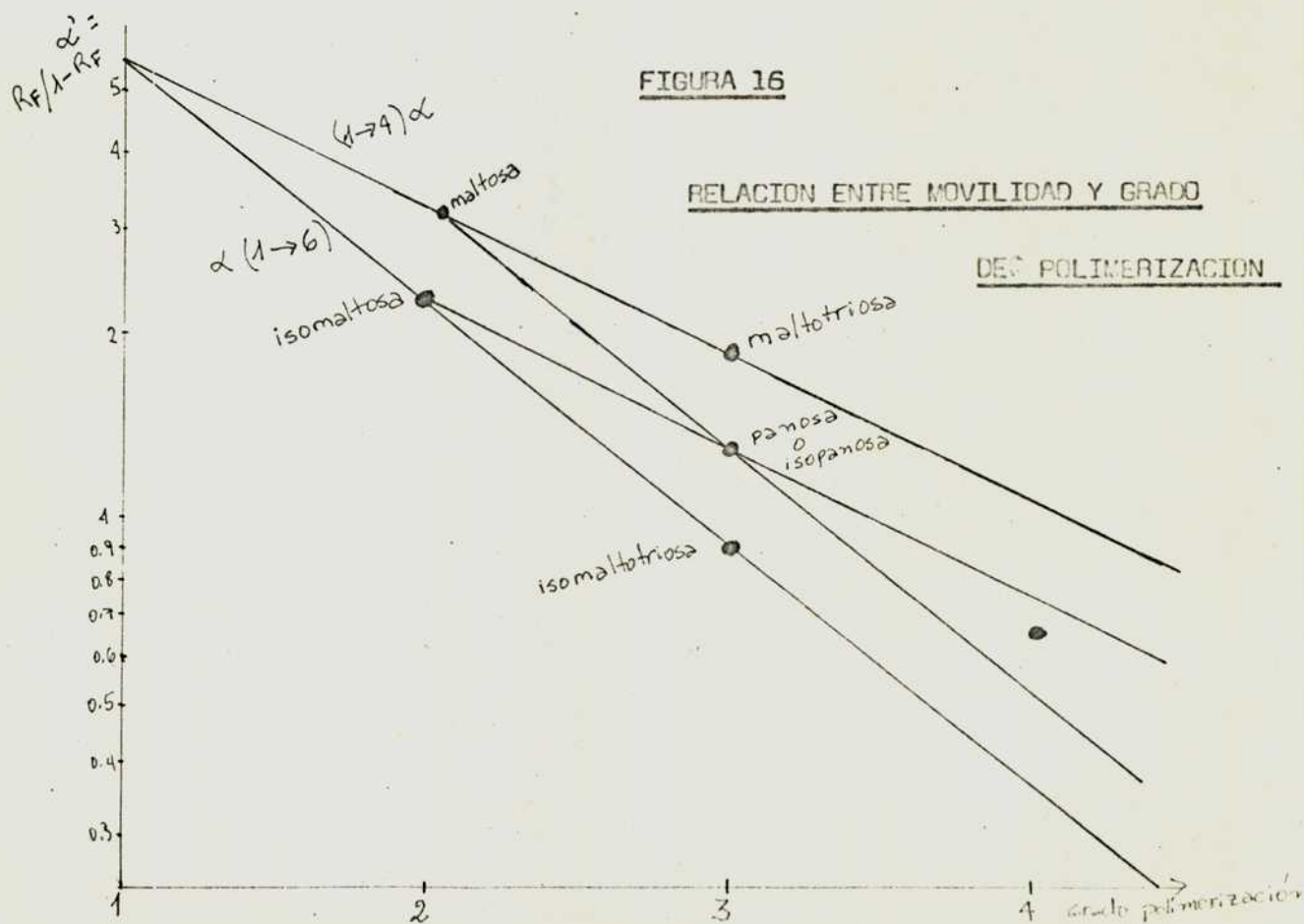


TABLA 13

GLUCOSA LIBERADA POR ACCION DE LA AMILOGLUCOSIDASA

Muestra	Incubación (horas)	moles de glucosa (0.1 ml)	mg glucosa	% hidrólisis
Polisacárido	2	0.22	1.98	29
Polisacárido	24	0.66	6.9	102
Amilosa	2	0.35	3.19	62
Amilosa	24	0.54	4.84	94

TABLA 14

CIEN. GAS LIQUIDO DE LOS PRODUCTOS DE HIDROLISIS ACIDA PARCIAL

Muestra (como TMS éter)	Tr
Sorbitol	3'
Maltitol	8' 24"
Isomaltitol	9' 20"
Polisacárido hidrolizado y reducido	3' ; 8' 20" ; 9' 20"

El hidrolizado se separó en tres fracciones por cromatografía en papel. Una de ellas consistía casi exclusivamente en glucosa y fue desechada. Las otras dos fueron sometidas separadamente a una cromatografía analítica en una columna de Sephadex G-10, previamente calibrada con el polisacárido sin degradar, maltosa y glucosa. Las curvas obtenidas se ven en la Figura 17.

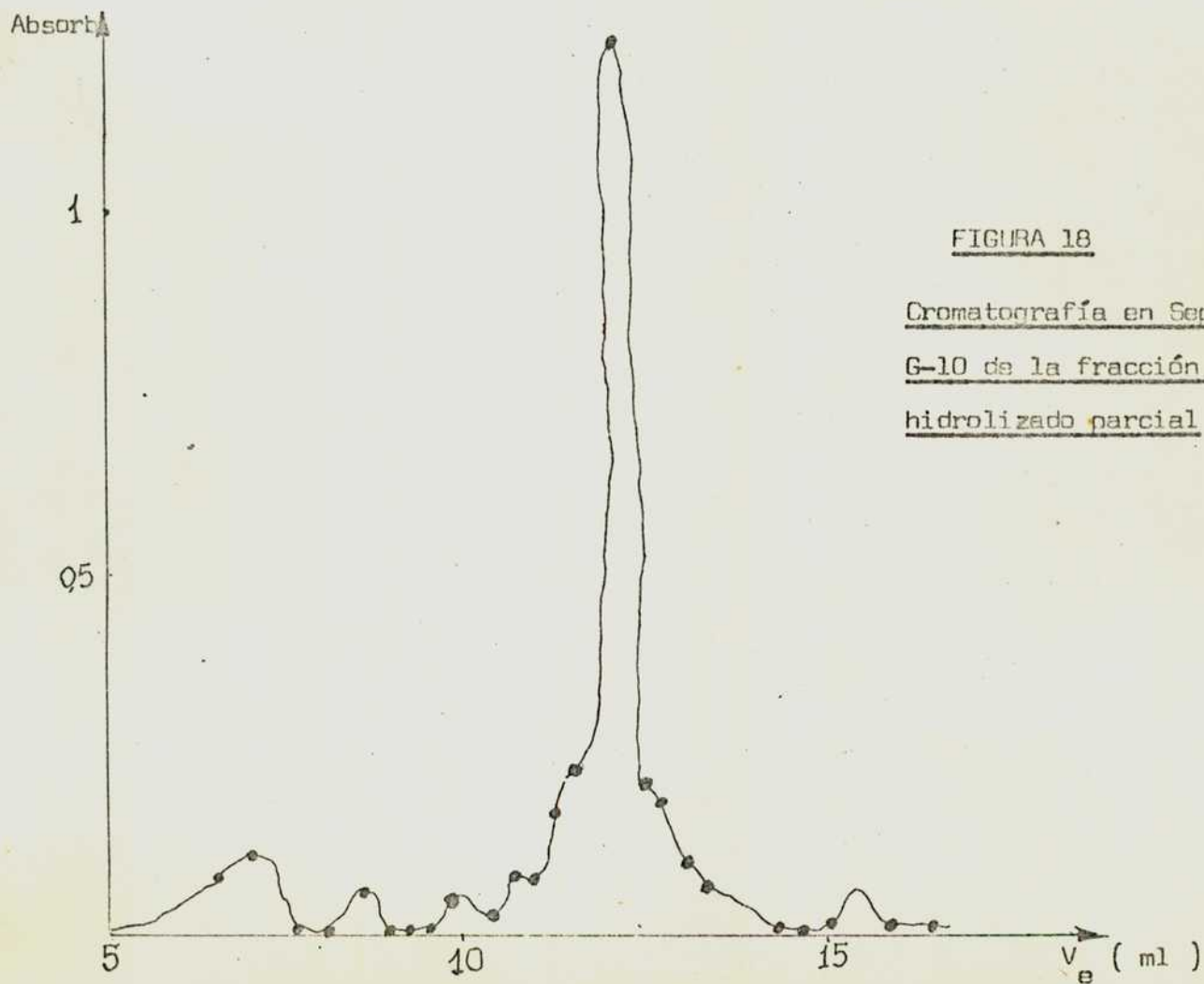
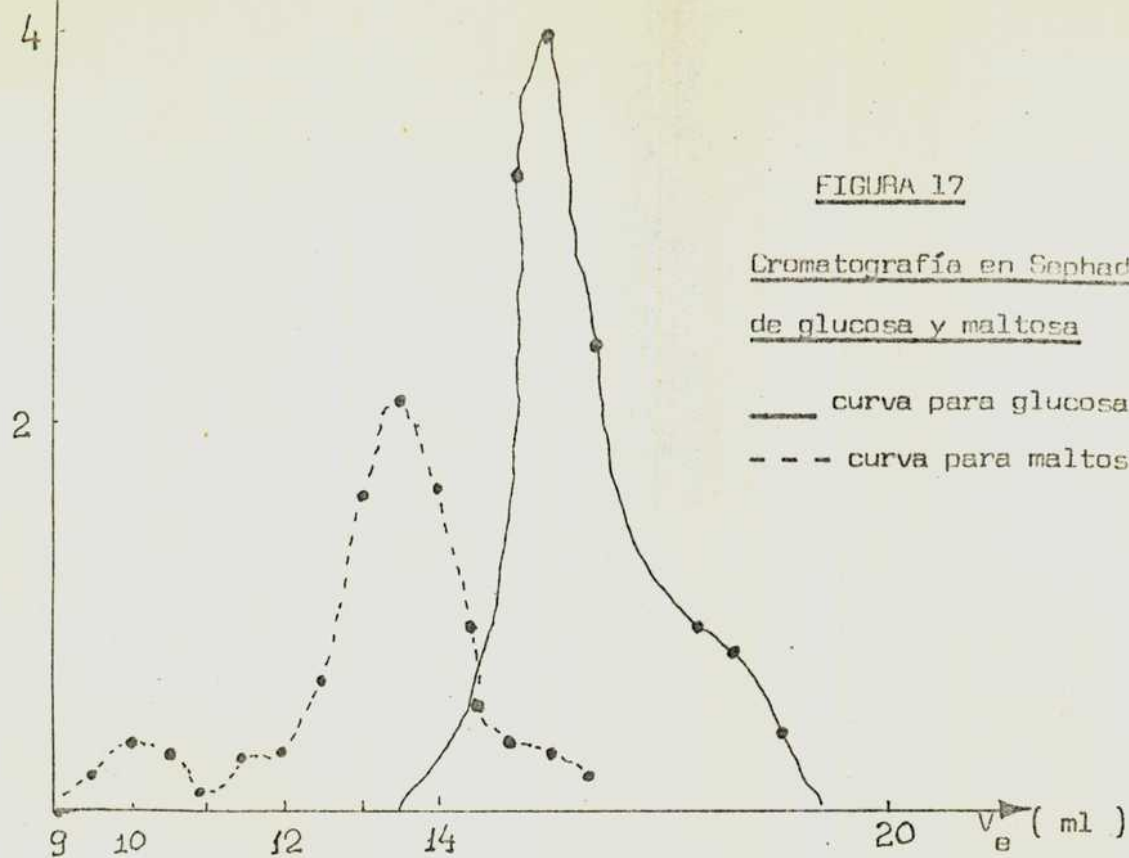
Cada una de las fracciones obtenidas se analizaron por cromatografía en papel.

De acuerdo a este análisis, la fracción dos del hidrolizado consiste principalmente en isomaltosa con trazas de glucosa y maltotriosa. Considerando el V_e de la maltosa (13,5 ml) podría no observarse el pico correspondiente si estuviera en pequeña proporción (Figura 18).

La fracción 3 del hidrolizado presenta también como producto principal isomaltosa junto a oligosacáridos mayores (Fig 19). De las cromatografías en papel de los mismos y relación entre el R_f y grado de polimerización, se obtuvieron resultados análogos a los ya discutidos respecto de la posible identidad de dichos oligosacáridos (Figura 20).

La acetólisis del polisacárido de Cyttaria hariatii Fischer se realizó siguiendo la técnica descrita por Matsuda y col (1961), por tratamiento con una mezcla de anhídrido acético:ácido acético glacial:ácido sulfúrico (11:8:1,5). El acetolizado se desacetiló con metóxido de sodio en metanol y, por cromatografía en papel de la mezcla resultante, se observó glucosa y maltosa en gran proporción junto con maltotriosa.

Se separó la glucosa por cromatografía preparativa en papel, y se analizó la mezcla de oligosacáridos en una columna de Sephadex G-10 tal como se hizo con el producto de hidrólisis ácida parcial. La curva obtenida confirmó la presencia de glucosa, maltosa y maltotriosa (Fig 21). También se observó un oligosacárido que eluía en el V_e de la columna.



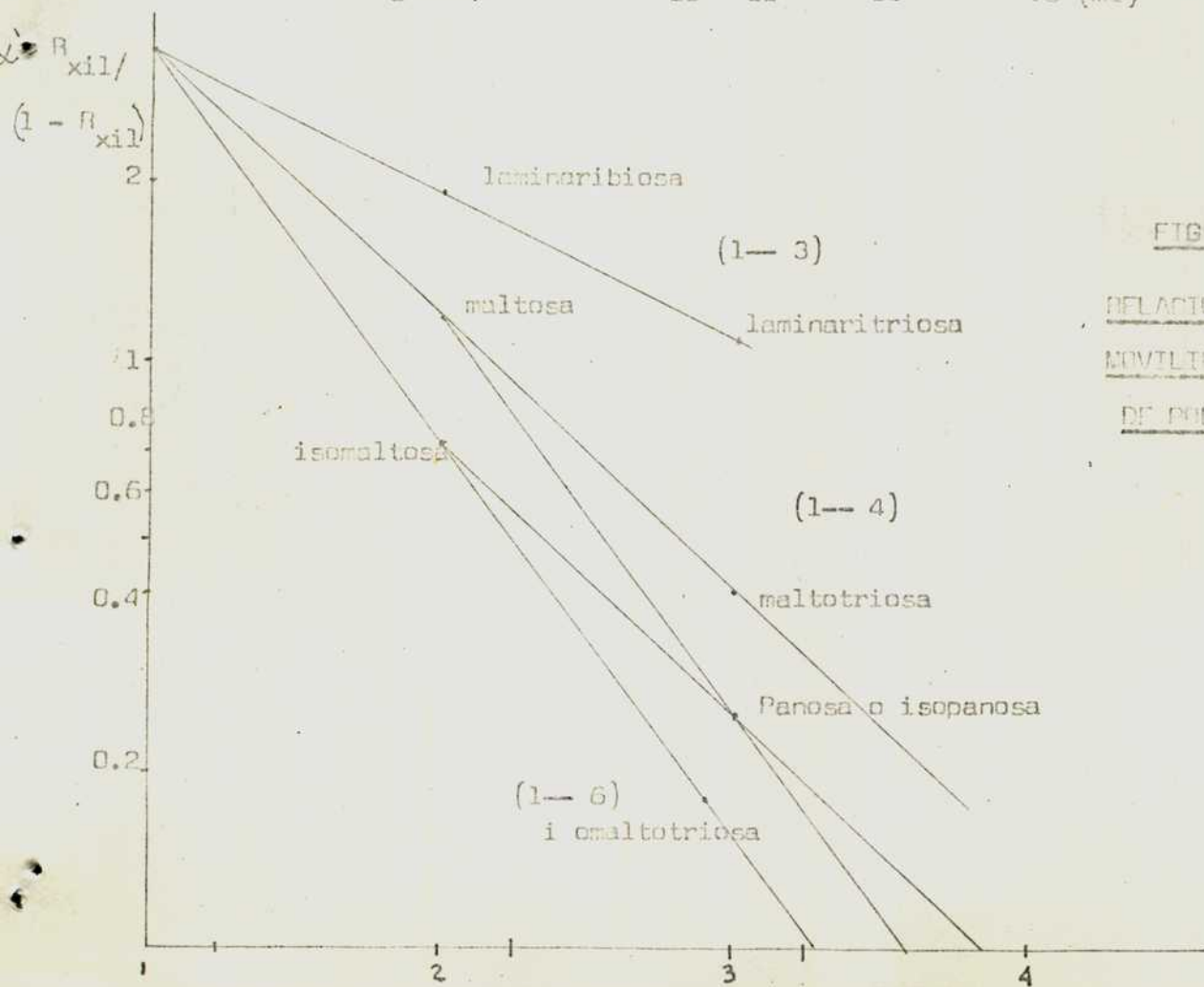
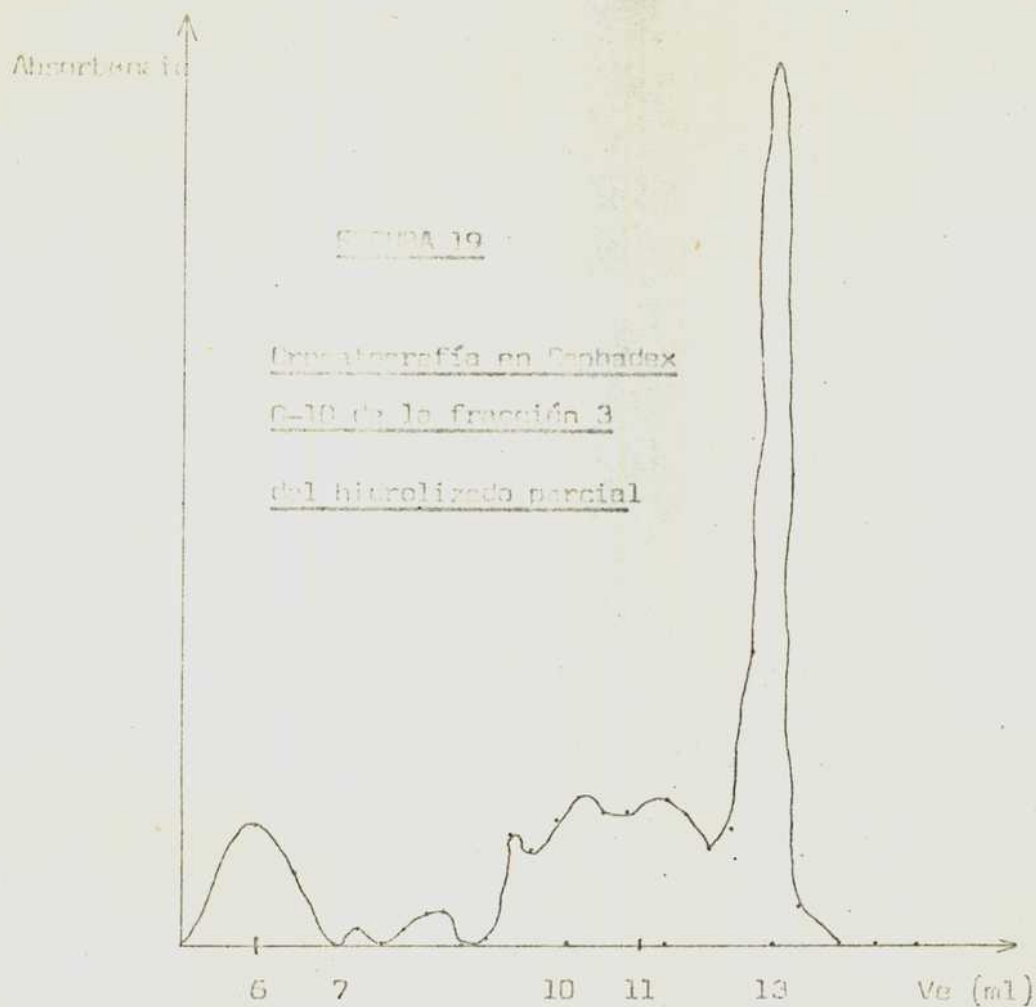
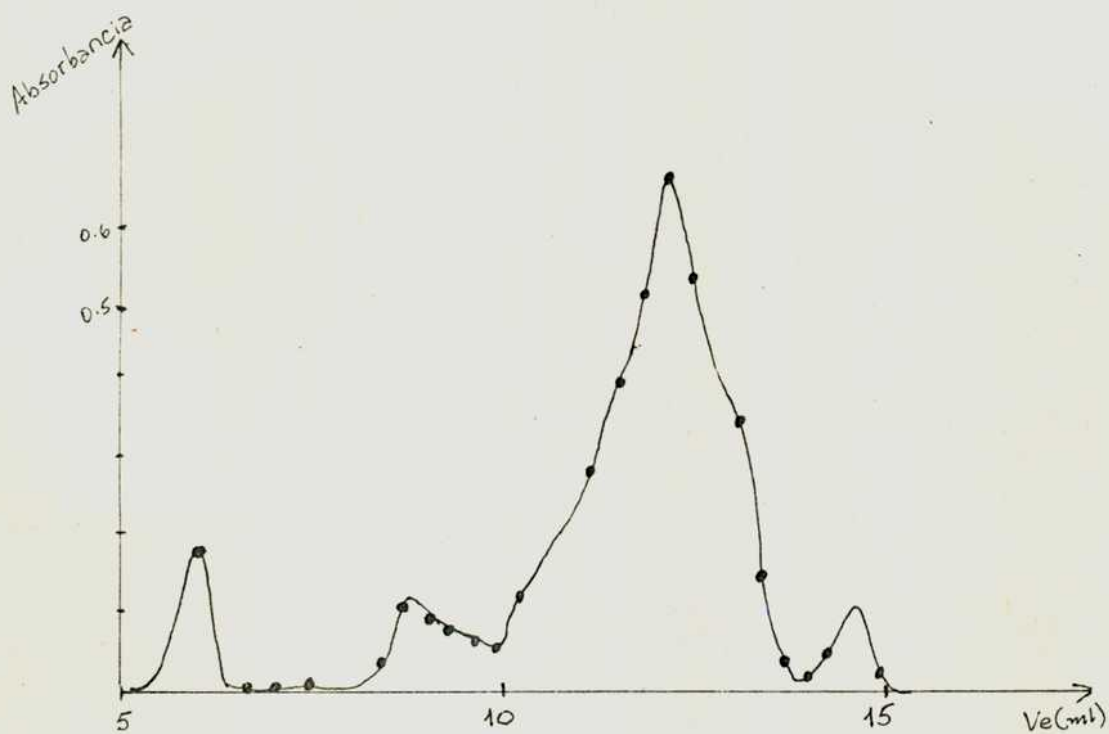


FIGURA 21



CROMATOGRAFIA EN SEPHADEX G-10 DEL PRODUCTO DE ACETOLISIS

Los datos obtenidos a partir de la degradación del polisacárido en medios ácidos permitieron detectar la presencia de uniones alfa-D-(1→4) y alfa-D-(1→6). El hecho de obtener mayor proporción de isomaltosa que de maltosa en la hidrólisis con ácido sulfúrico, mientras que prácticamente no se observó isomaltosa en los productos de acetólisis, está de acuerdo con los estudios realizados por Wolfrom y col (1953, 1951) sobre la velocidad de hidrólisis en medio ácido de los distintos disacáridos de D-glucosa, ya que la constante de velocidad de hidrólisis ácida (ClH 0.1N) de la maltosa y nigerosa es tres veces mayor que la correspondiente a la isomaltosa (Tabla 15).

TABLA 15

VELOCIDAD DE HIDROLISIS DE DISACARIDOS DE GLUCOSA EN ClH 0.1 N

Disacárido	Unión	k.10 ⁴ min ⁻¹	
		80°	99.5°
celobiosa	beta-D-(1→4)	0.66	6.6
maltosa	alfa-D-(1→4)	1.55	16.3
gencibiosa	beta-D-(1→6)	0.53	7.2
isomaltosa	alfa-D-(1→6)	0.40	5.0
soforosa	beta-D-(1→2)	1.17	10.1
kojibiosa	alfa-D-(1→2)	1.46	17.3
laminaribiosa	beta-D-(1→3)	0.99	9.3
nigerosa	alfa-D-(1→3)	1.78	14.1

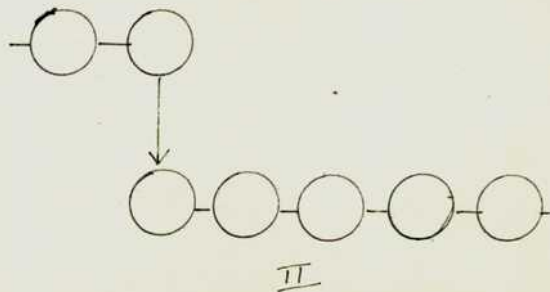
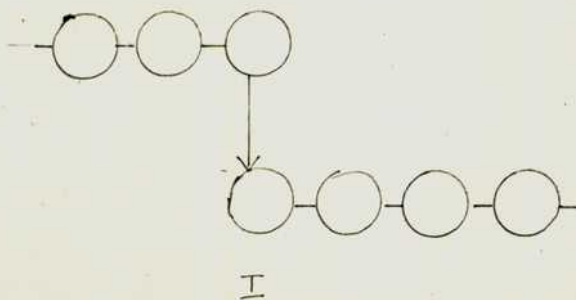
A diferencia de lo que sucede en la hidrólisis ácida, la unión alfa-D-(1→6) en la acetólisis es más susceptible al ataque que las otras. Matsuda y col (1961) comprobaron que la isomaltosa se convertía por acetólisis totalmente en glucosa (6 h, 25°) mientras que la nigerosa en estas condiciones permanecía inalterada. Una explicación de este hecho es que las uniones 1→6 primarias, están más favorecidas estéricamente que una unión secundaria para el ataque por un ion acetilio (CH_3CO^+) (Rosenthal, 1961). En cambio, las uniones secundarias se rompen más fácilmente en el medio de hidrólisis ácida, en el que son los factores electrónicos los determinantes de la ruptura (Esquema 8).

Vemos así que ambos métodos se complementan y el no encontrar trazas de nigerosa en el producto resultante de la acetólisis del polisacárido, permite suponer que no existe, en proporción apreciable, uniones alfa-D-(1→3) en el glucano.

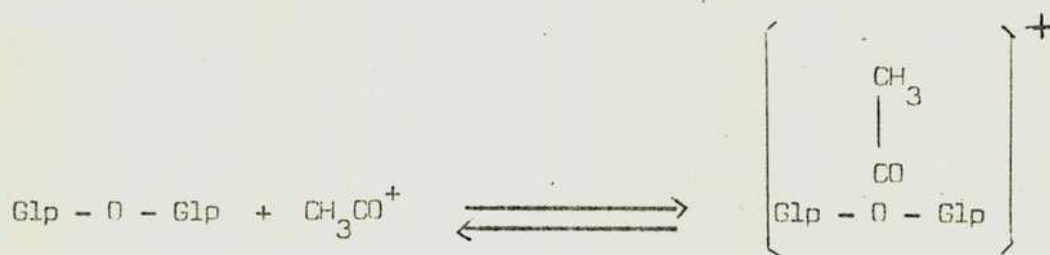
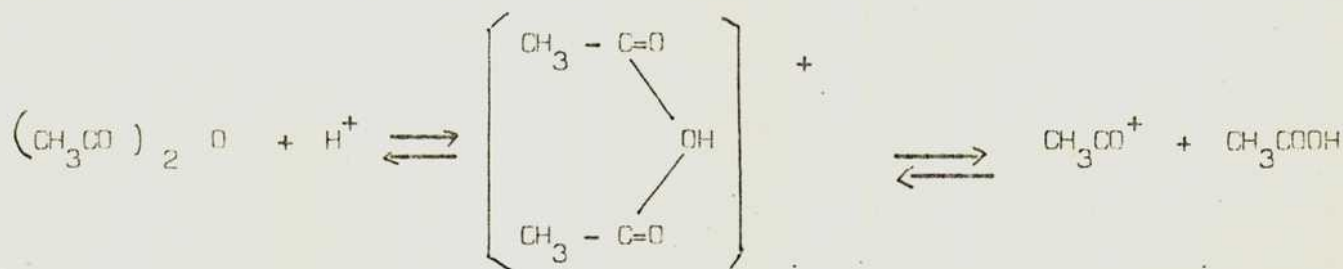
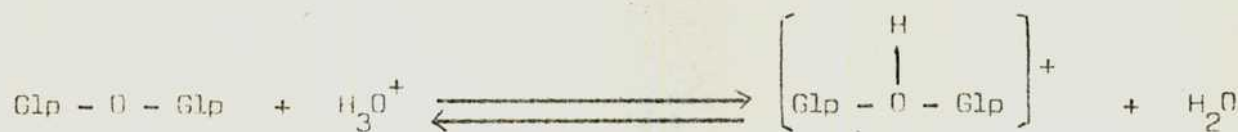
ESTUDIOS ENZIMATICOS

El polisacárido tratado con alfa amilasa bacteriana en buffer glicerofosfato de sodio 15 mM (pH 5.7) presentaba, luego de 72 horas de incubación a 37°, un 8% de poder reductor.

Teniendo en cuenta que los oligosacáridos más pequeños que puede liberar la enzima son 6²-alfa-maltosilmaltotriosa y 6-alfa-D-glucopiranosilmaltotriosa, podemos decir que deben existir por lo menos tres o cuatro uniones alfa-D-(1→4) contiguas en una estructura ramificada, para que sobre la misma actúe la alfa amilasa, tal como se ve en los modelos I y II.



ESQUEMA 8



El pequeño porcentaje de hidrólisis producido por la enzima en el glucano en estudio, permite concluir que en el mismo no hay más de 2 uniones alfa-D-(1→4) contiguas.

Los resultados obtenidos al tratar el polisacárido con amiloglucosidasa ya han sido descritos.

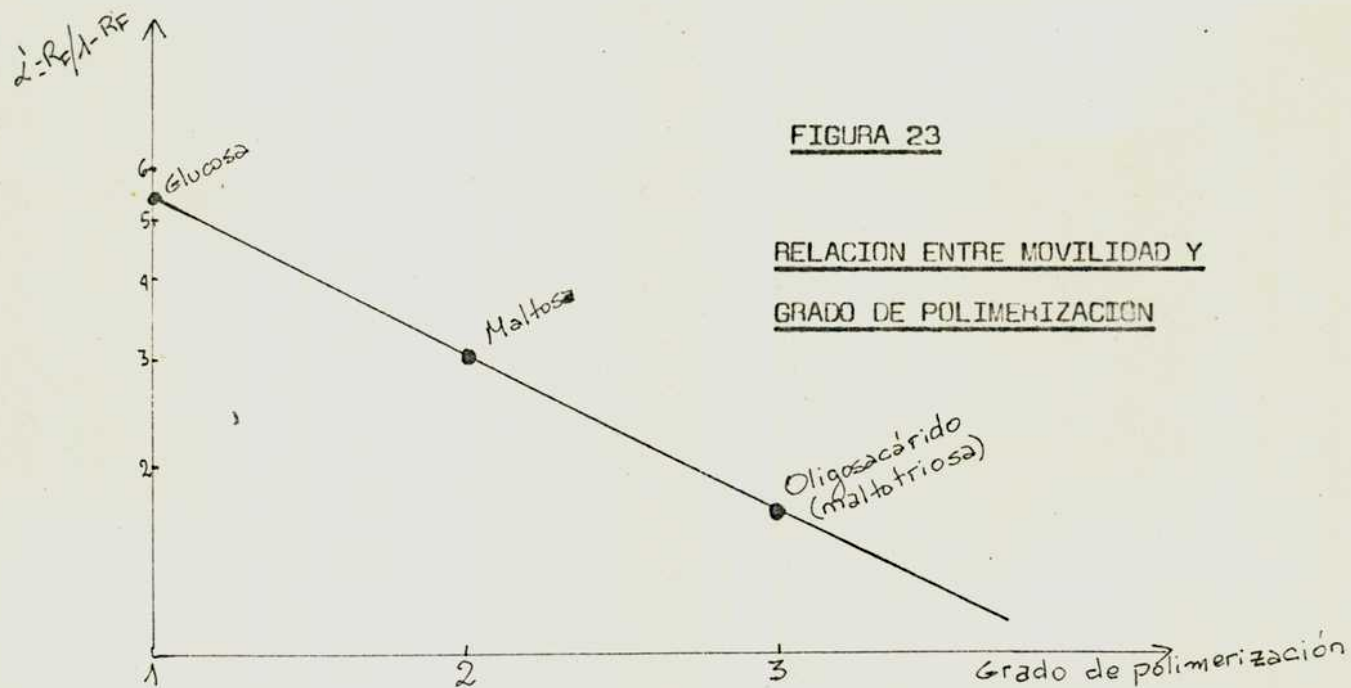
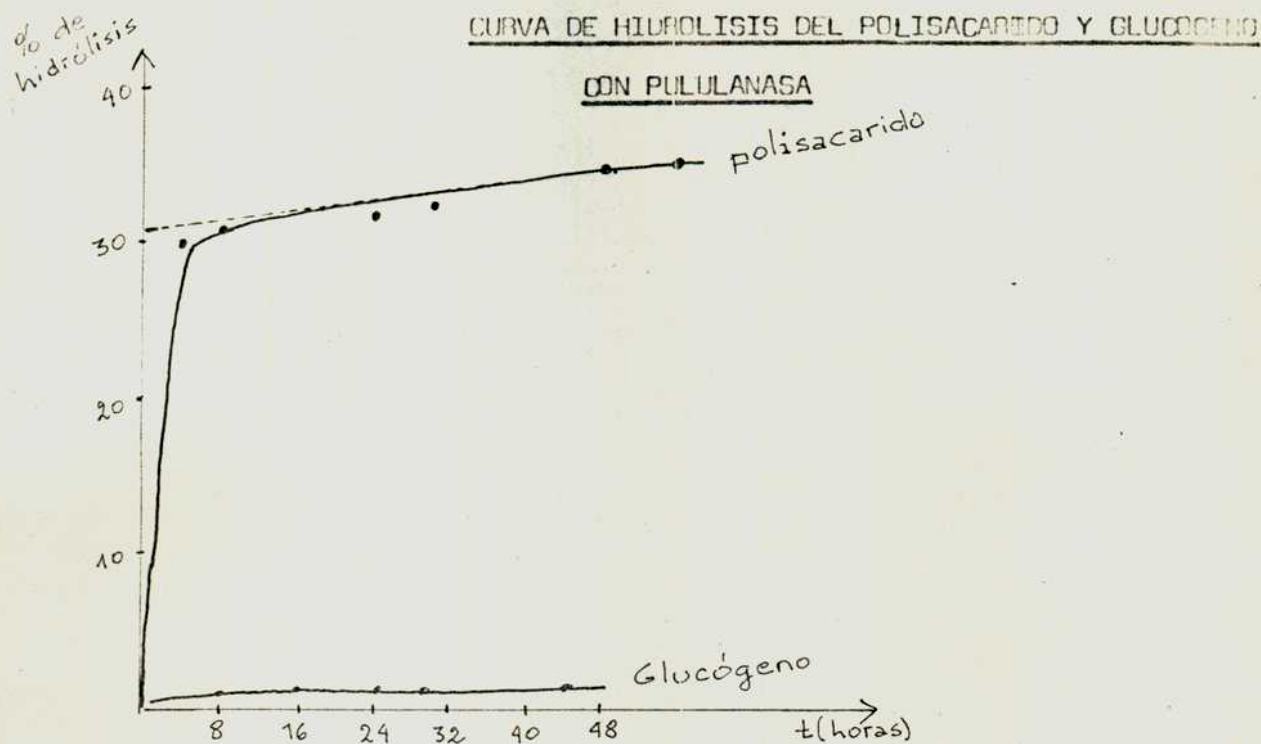
El glucano fue tratado con pululanasa bacteriana en buffer citrato de sodio-ácido cítrico 10^{-2} M, pH 5, siguiendo el procedimiento descrito por Lee y Whelan (1966) y se determinó el poder reductor a distintos intervalos de tiempo. Se obtuvo un poder reductor final de 33% (expresado como glucosa), mientras que el glucógeno prácticamente no fue atacado por la enzima en las mismas condiciones. En la Figura 22 se ven las curvas de hidrólisis de ambos polisacáridos.

Por cromatografía en papel del producto de hidrólisis aparecía un único oligosacárido que, de acuerdo al gráfico de log alfa' en función del grado de polimerización, debía ser C-alfa-D-glucopiranosil-(1→4)-alfa-D-glucopiranosil-(1→4)-alfa-D-glucopiranososa (maltotriosa, Fig 23).

Una hidrólisis preparativa (400 mg del polisacárido) permitió la identificación de este oligosacárido. La incubación se realizó dentro de una bolsa de diálisis, deteniéndose al cabo de 8 horas. Este procedimiento fue adoptado debido a que en los últimos períodos de la hidrólisis con pululanasa aparecían trazas de glucosa y maltosa por lo que se supuso que podría haber alguna glucosidasa contaminante. De esta manera se evitaba que actúe la enzima contaminante sobre los oligosacáridos pequeños que se iban produciendo.

Quedaron así dos fracciones que fueron analizadas por separado.

FIGURA 22



Fracción A (solución exterior a la bolsa de diálisis). Luego de eliminar las sales por tratamiento con resinas ácida y básica, quedó un producto cromatográficamente puro (cromatografía en papel y geles, Fig 24). Su poder rotatorio $[\alpha]_D = +159$ coincidía con el de la maltotriosa (Pazur, 1955), así como el punto de fusión (134° - 137°) y $[\alpha]_D = +92$ de su acetato que coincidían con los del hendecaacetato de maltotriosa.

El espectro RMN del oligosacárido presentaba, en la zona de los H glicosídicos una señal a delta 5.4 ($J=3$) (Fig 25). Según Usui y col (1974) este valor corresponde al H glicosídico de una unión alfa-D-(1 \rightarrow 4) glucosídica. En la Tabla 16 se observan los valores encontrados por ellos para distintos oligosacáridos.

De todas las evidencias experimentales podemos decir que el oligosacárido producido en la hidrólisis con pululanasa es maltotriosa.

Fracción B (solución interior a la bolsa de diálisis). Se calentó durante unos minutos para desactivar la enzima y luego se desalinificó tal como se hizo con la fracción A. Por cromatografía en papel se observó que consistía mayormente en maltotriosa aún cuando había oligosacáridos mayores de menor movilidad. Se separó la maltotriosa por cromatografía en papel descartándose y eluyendo por separado las otras fracciones.

Una de ellas era cromatográficamente pura. Su grado de polimerización (Unrau y Smith, 1957) dio un valor de 492 si la unión terminal es a través del O del C-6 (lo cual correspondería a un trisacárido) o 984 si es a través del O del C-4 (lo cual correspondería a un hexasacárido).

La acción de la pululanasa sobre este oligosacárido, dio un único producto cuyo R_g coincidía con el de la maltotriosa. Esto indicaba que el oligosacárido era alfa-D-maltotriosil-alfa-D-maltotriosa

FIGURA 24

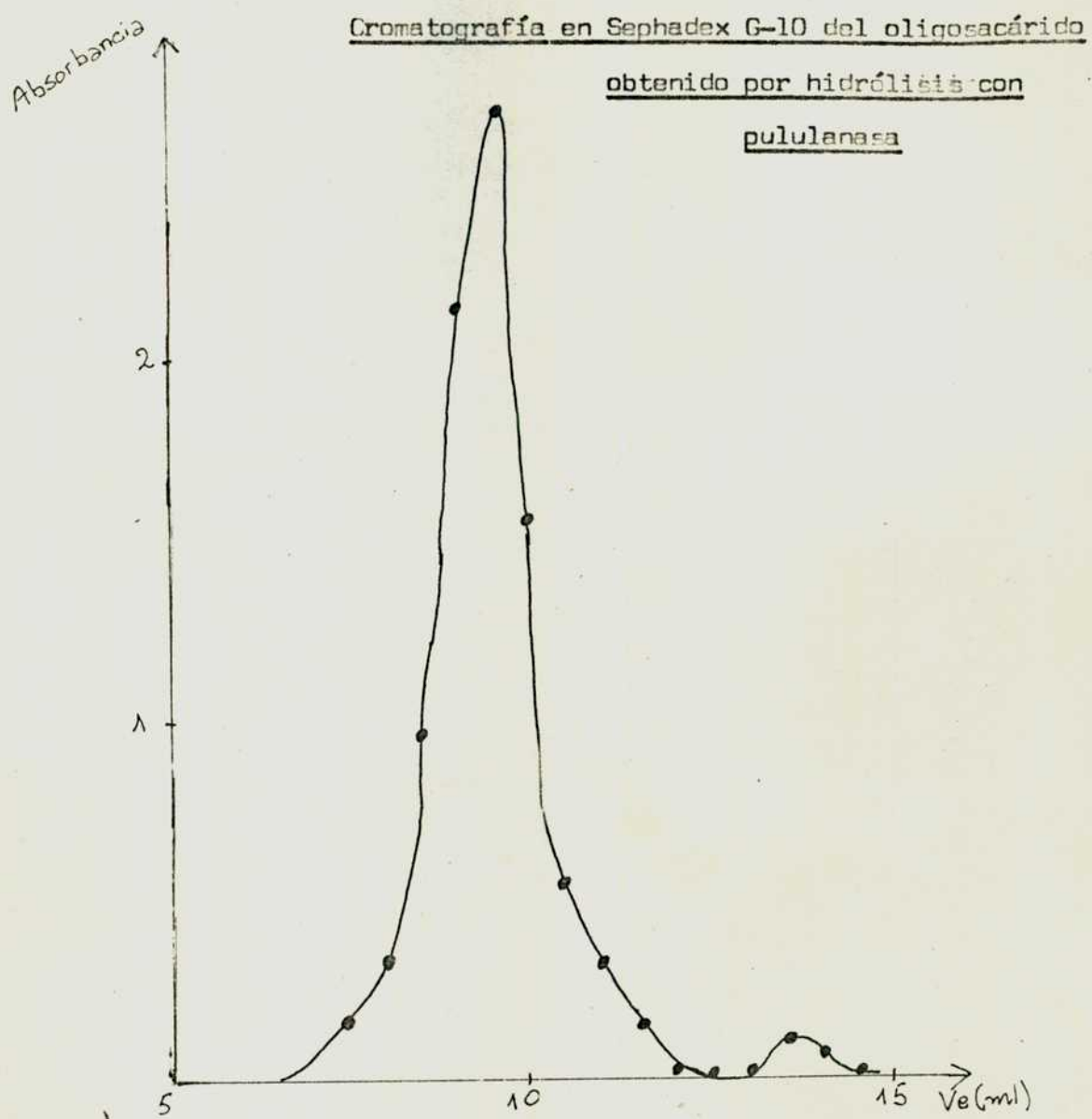
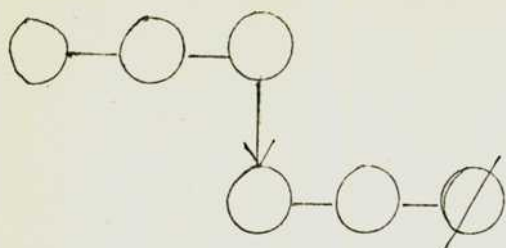


TABLA 16

DESPLAZAMIENTOS QUÍMICOS DE LOS H GLICOSÍDICOS Y ANOMÉRICOS DE OLIGOSACÁRIDOS

Oligosacárido	Tipo de unión	H anómérico		H glicosídico	
		H-1 alfa (ppm)	H-1 beta (ppm)	H-1' (ppm)	H-1'' (ppm)
α, α , trehalosa	alfa (1—1)		^a	5.20 (3.0)	
kojibiosa	alfa (1—2)	5.47 (3.0)	4.83 (7.3)	5.13 (3.0) 5.39 (3.0)	
Nigerosa	alfa (1—3)	5.27 (3.0)	4.69 (7.5)	5.38 (3.0)	
Maltosa	alfa (1—4)	5.26 (3.0)	4.67 (7.5)	5.4 (3.0)	
Isomaltosa	alfa (1—6)	5.28 (3.0)	4.68 (7.0)	4.99 (3.0)	
Maltotriosa	alfa (1—4)				
	alfa (1—4)	5.27 (3.0)	4.66 (7.5)	5.4 (3.0)	5.4 (3.0)
Panosa	alfa (1—6)				
	alfa (1—4)	5.27(3.2	4.67 (7.7)	5.41 (3.0)	5.0(3.0)
Isopanosa	alfa (1—4)				
	alfa (1—6)	5.29 (3.0)	4.68 (7.5)	4.99 (3.0)	5.4(3.0)
Laminaribiosa	alfa (1—3)	5.28 (3.0)	4.71 (7.5)	4.74 (7.5)	
Celobiosa	beta (1—4)	5.26 (3.0)	4.68 (7.5)	4.52 (7.5)	
Genciobiosa	beta (1—6)	5.25 (3.0)	4.67 (7.0)	4.56 (7.5)	

(a) los valores entre paréntesis corresponden a las constantes de acoplamiento expresadas en Herz.



alfa-D-maltotriosil-alfa-D
maltotriosa

También considerando el α_D del oligosacárido = + 170 (H_2O) se puede descartar que se trate de maltotriosa, panosa o isopanosa y por lo tanto la posibilidad de que sea 3 el grado de polimerización. Si se construyen las curvas de poder rotatorio para oligosacáridos con uniones alfa-D-(1 \rightarrow 4) glucosídicas y oligosacáridos con uniones alfa-D-(1 \rightarrow 6) glucosídicas (Figura 26) el valor obtenido para el hexasacárido es un punto entre ambas curvas, lo cual permite suponer que tiene ambos tipos de uniones (observar que el valor de panosa e isopanosa aparece entre los de maltotriosa e iso-maltotriosa).

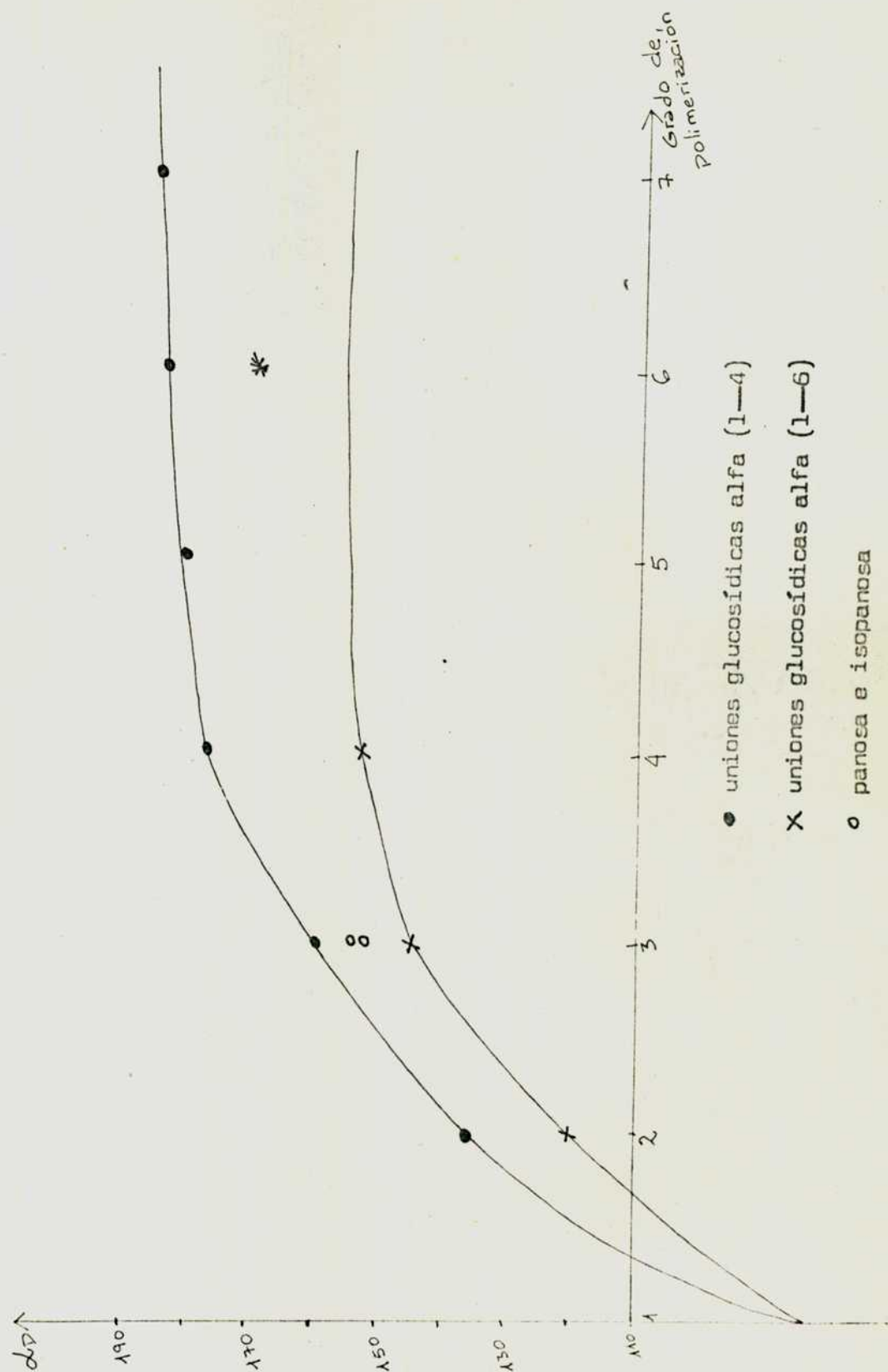
La otra fracción consistía en oligosacáridos de muy poca movilidad (R_g menor que 0.1) y que se convertían totalmente en maltotriosa por acción de pululanasa.

Los estudios enzimáticos indicaron así que el polisacárido es, básicamente, un polímero constituido por residuos de alfa-D-maltotriosa unidos por uniones alfa-D-(1 \rightarrow 6).

La aparición de maltosilmaltotriosas con grado de polimerización 6 y mayor se explica por el mecanismo endo de acción de la pululanasa sobre polisacáridos lineales.

FIGURA 26

CURVAS DE PODERES ROTATORIOS PARA SERIES HOMOLOGAS DE OLIGOSACARIDOS



● uniones glucosídicas alfa (1-4)
 X uniones glucosídicas alfa (1-6)

○ panosa e isopanosa

* oligosacárido producido por hidrólisis controlada

ESQUEMA 9

ESTUDIOS ENZIMATICOS : RESULTADOS

<p>polisacárido de Cyttaria harloti Fischer</p>	<p>→</p>	<p>alfa amilasa,buffer glicerofosfato 72 horas , 37° , pH 5.7</p>	<p>Conversion</p>	<p>Cromatografía</p>
		<p>→</p>	<p>8% (expresado como glucosa)</p>	<p>no se observan productos de movilidad apreciable</p>
		<p>amiloglucosidasa,buffer acetato 24 horas , 37° , pH 4.8</p>	<p>102% (expresado como glucosa)</p>	<p>glucosa</p>
		<p>pululanasa , buffer citrato 48 horas , 37° , pH 5</p>	<p>31% (expresado como glucosa)</p>	<p>Maltotriosa.Después de 48 h de incubación aparecen trazas de glucosa y maltosa.</p>
		<p>pululanasa , buffer citrato 8 horas , 37° , pH 5 en bolsa de diálisis</p>		<p>aislamiento e identificación de alfa-D-maltotriosa Polímeros de alfa-D-maltotriosa unidos a través del O del C-6</p>

ESTUDIOS DE OXIDACION CON METAPERIODATO DE SODIO

Los resultados obtenidos por oxidación con periodato de sodio del polisacárido (Tabla 17) , corresponden a un consumo de 1.28 moles de periodato de sodio por mol de glucosa anhidra con formación de 0.33 moles de ácido fórmico por mol de glucosa anhidra.

Las determinaciones del consumo de periodato se hicieron según el método de Fleury y Lange (1933) . El ácido fórmico proviene de las uniones $1 \rightarrow 6$ más las unidades terminales. Se dosó paralelamente la glucosa remanente (o sea el porcentaje de uniones no atacadas por el oxidante) obteniéndose un valor de 3-4% cuando la oxidación fue completa.

El oxopolisacárido obtenido en la oxidación con periodato se redujo con borohidruro de sodio y se hidrolizó el polialcohol resultante . Se determinó la relación molar de eritritol:glicerol:glucosa (29:63:7) en la mezcla (Tabla 18) por cromatografía gas líquido de los TMS éteres del hidrolizado y de mezclas cuantitativas de standards, de acuerdo al método descrito por Dutton y col (1968).

Los datos de consumo de periodato y producción de ácido fórmico dan idea del tipo y proporción de uniones glucosídicas presentes en el polisacárido (Bobbitt, 1956). Los residuos piranósicos unidos a través del C-1 y C-4 (II) ó C-1 y C-2 (III) consumen un mol de oxidante . Las uniones piranósicas $1 \rightarrow 3$ (IV) y las ramificadas en C-2 y C-4 (VI) son resistentes a la oxidación, mientras que las uniones $1 \rightarrow 6$ (V) y los grupos terminales no reductores (I) consumen dos moles de periodato y liberan un mol de ácido fórmico (Figura 27) .

De acuerdo con esto, los resultados obtenidos son algo menores que los esperados para un polímero de 6^3 -alfa-D-maltotriosa (0.33 moles de ácido fórmico por mol de glucosa anhidra y 1.32 moles de periodato/mol de glucosa anhidra) (Esquema 10).

TABLA 17

RESULTADOS DE LA OXIDACION CON PERIODATO DEL POLISACARIDO

Tiempo	1 h	3 h	5 h	1 día	3 días	4 días	5 días	6 días	8 días	10 días
Consumo de IO_4^- (moles/mGa)	0.49	0.49	0.53	0.88	1.05	1.12	1.28	1.22	1.28	1.32
ácido fórmico (moles/mGa)	0.11	0.13	0.14	0.28	0.31	0.34	0.34	0.34	0.39	0.39
glucosa remanente (moles/mGa)	-	0.32	-	0.17	0.166	0.10	-	0.04	0.03	0.03

TABLA 18

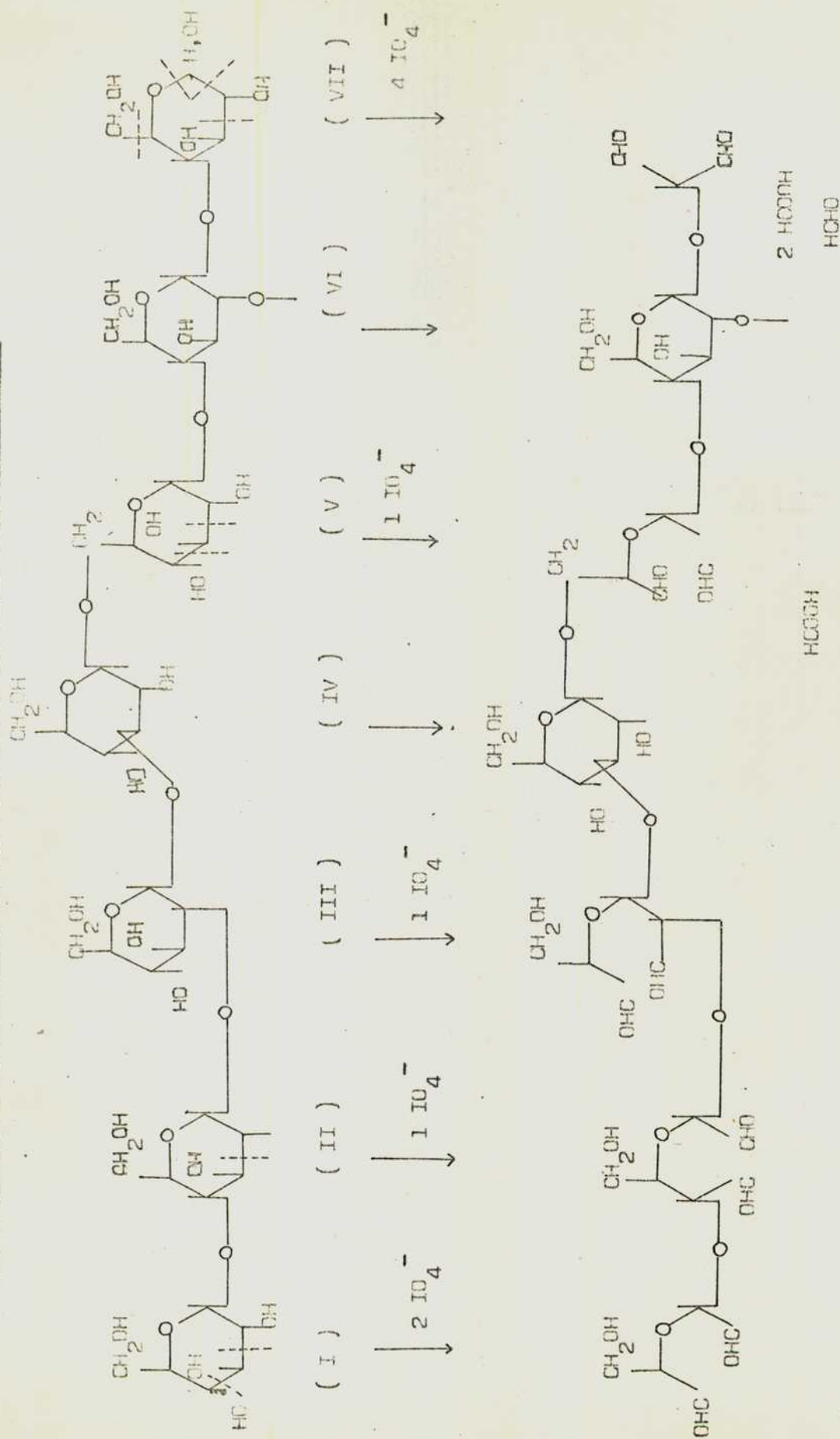
RELACION ERITRITOL:GLICEROL:GLUCOSA EN EL OXOPOLISACARIDO REDUCIDO
E HIDROLIZADO

	Eritritol	Glicerol	Glucosa
Relación molar (standards)	1.60	0.81	0.60
Areas patrones ^(a)	1.88	0.91	0.70
Areas relativas ^(a) (hidrolizado)	10.25	4.75	1.00
Relación molar (hidrolizado)	63	29	7.00

(a) obtenido por triangulación de los picos que aparecen y como promedio de 5 corridas hechas en las mismas condiciones

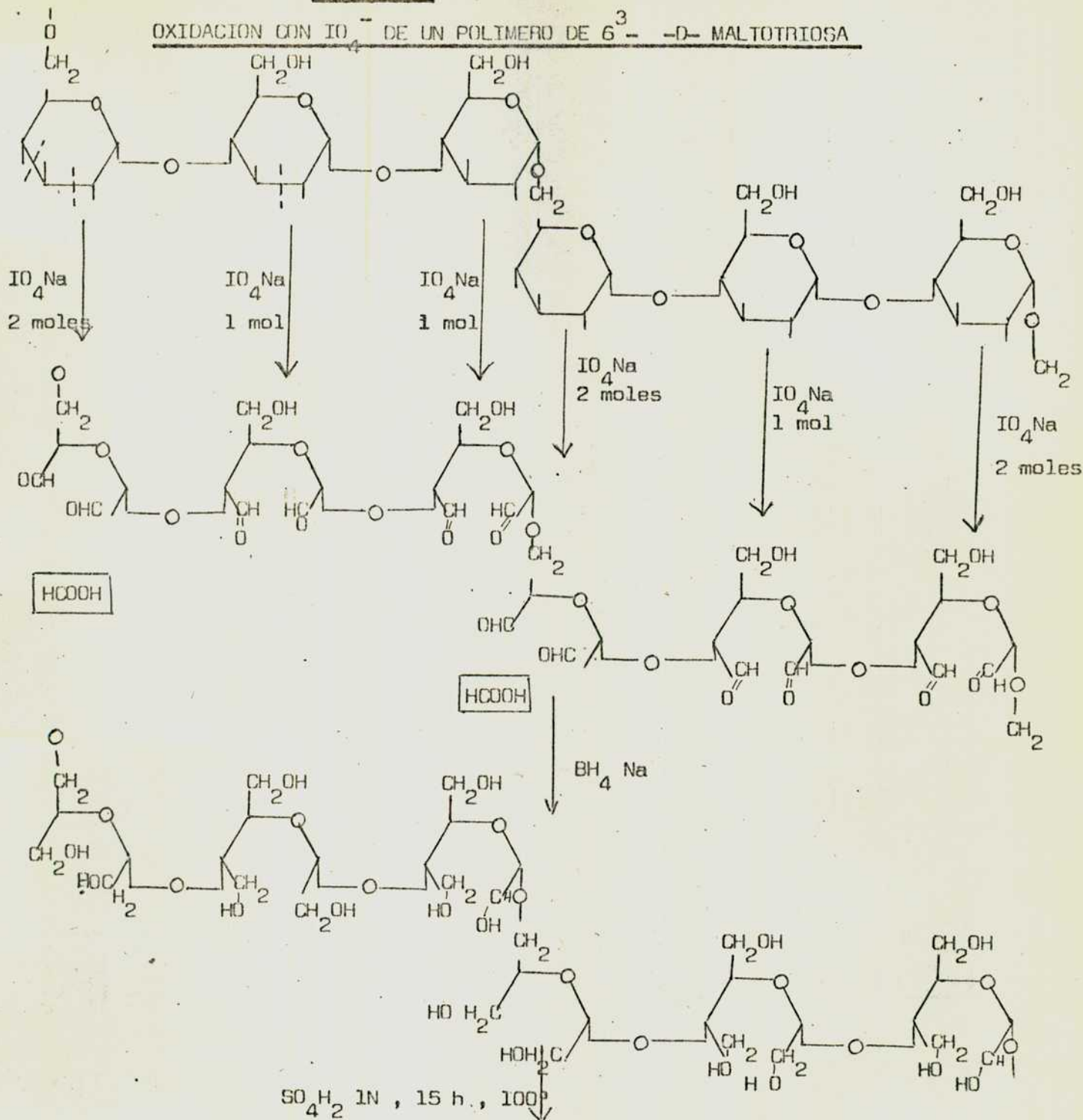
FIGURA 27

ACCION DE PERIODATO SOBRE UNIDADES PIRANOSICAS CON DISTINTO TIPO DE UNION



ESQUEMA 10

OXIDACION CON IO_4^- DE UN POLIMERO DE 6³ -D- MALTOTRIOSA



eritritol

glicerol

+

gliceraldehido

eritritol

+

gliceraldehido

eritritol

+

glicer.

glicerol

+

glicer.

eritritol

+

glicer.

eritritol

+

glicer.

El análisis cuantitativo de los productos obtenidos por reducción e hidrólisis total del polisacárido reducido (luego de la oxidación con IO_4Na), también permite conocer el tipo de uniones glicosídicas presentes. Si el glucano es lineal con uniones $1 \rightarrow 4$ se obtendrá eritritol y aldehído glicólico además de glicerol proveniente de los extremos reductores y no reductores. Un glucano unido $1 \rightarrow 6$ da glicerol y gliceraldehído y de las uniones $1 \rightarrow 3$ se obtiene glucosa. La relación eritritol:glicerol:glucosa encontrada está de acuerdo con los datos obtenidos por titulación. El hecho de encontrarse un 7% de glucosa remanente (CGL) indicaría la posibilidad de que hubiera uniones $1 \rightarrow 3$ en el glucano.

Se reoxidó el polialcohol y se midió el consumo de periodato y glucosa remanente a distintos intervalos de tiempo. No hubo consumo de oxidante y la glucosa dio un valor constante de 4%.

Ishak y Painter (1974) observaron que bajo condiciones analíticas comunes, la proporción de residuos de D-glucosa resistentes a la oxidación con periodato en polisacáridos ramificados, era $1/3$ del número de ramificaciones y que dichos residuos se podían oxidar fácilmente luego de que los glucanos oxidados eran reducidos con borohidruro de sodio.

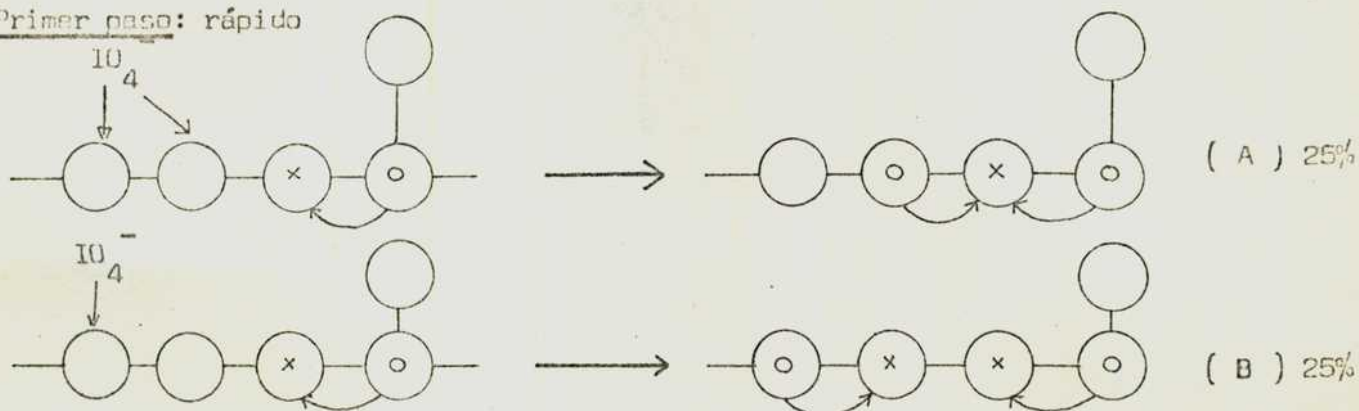
Ellos explicaron en base a modelos esos resultados experimentales y consideraron que, cuando un residuo de D-glucosa que lleva una ramificación en C-6 es oxidado, los dos grupos aldehído resultantes forman hemiacetales cíclicos de 6 miembros con los OH de una unidad vecina no oxidada en la misma cadena, mientras que cuando se oxidan los otros residuos de glucosa, solamente uno de los grupos aldehído muestra una fuerte tendencia a formar un hemiacetal de esta clase.

Se supone un ataque al azar en el cual la mitad de las glucosas potencialmente resistentes, se oxidan antes que los residuos de D-glucosa ramificados adyacentes. En el otro 50% de los casos pueden suceder dos cosas tal como se ve en el Esquema 14

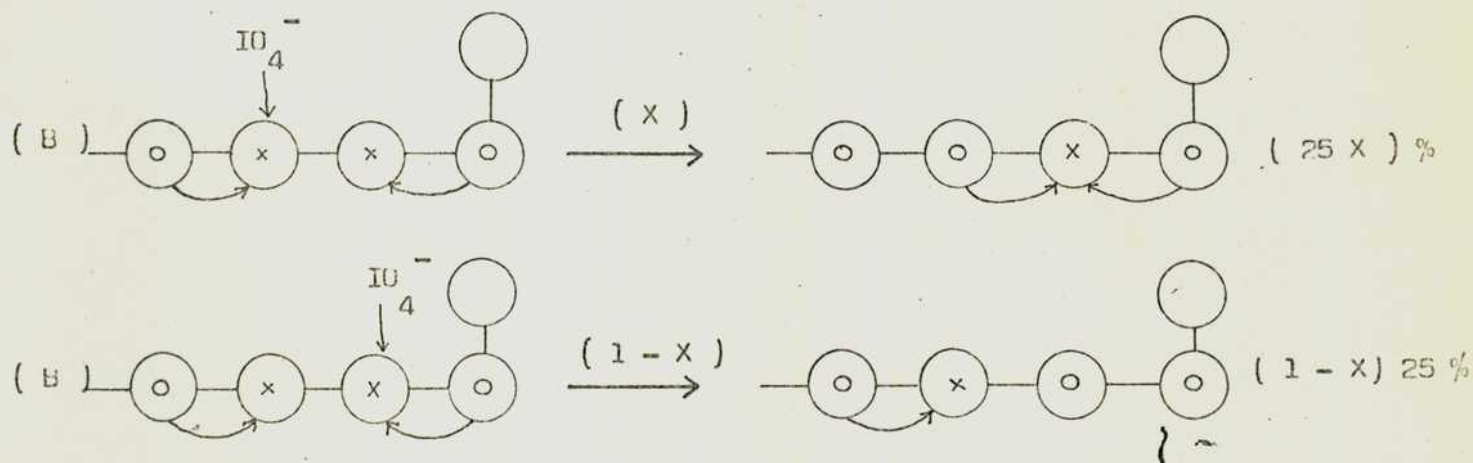
ESQUEMA 11

ORIGEN DE LOS RESIDUOS DE GLUCOSA RESISTENTES A LA OXIDACION
CON PERIODATO DE SODIO

Primer paso: rápido



Segundo paso: lento



○: residuo de D- glucosa oxidado

x: residuo de D- glucosa sin oxidar

Aquí se supone que las unidades no ramificadas, una vez oxidadas, inhiben la oxidación de las unidades que están a su derecha solamente. Cuando la glucosa no ramificada adyacente a la unidad potencialmente resistente se oxida primero, se genera un residuo doblemente inhibido (A). Si se oxida el siguiente, se genera una secuencia de pasos como en B. La fracción X no se conoce, por lo tanto en base a este modelo, sólo es posible concluir que la proporción de residuos de D-glucosa resistentes a la oxidación con IO_4^- debe ser al menos 25% y no mayor que 50% de la proporción de ramificaciones en el glucano.

Si por otro lado se considera que los residuos inhibidos por un solo extremo se oxidan a la misma velocidad que los no inhibidos, y tenemos solamente en cuenta el triplete de residuos consistente en aquel que es potencialmente resistente y sus vecinos, estos pueden ser atacados de seis maneras distintas, de las cuales dos darán lugar al residuo resistente, siendo entonces la proporción de los mismos 1/3 de las ramificaciones.

Ishak y Painter trabajaron con glucanos diferentes y encontraron resultados concordantes con esta teoría.

Si el glucano oxidado se reduce con Et_4Na , los residuos resistentes (X) se hacen susceptibles a la oxidación con IO_4^- . Un glucógeno que consumía 1.12 moles de IO_4^- por mg, todavía contenía, luego de ser oxidado durante 7 días, 4% de glucosa residual. El material reducido consumió luego 0.044 moles de IO_4^- , sin que quedara glucosa.

En el caso del glucano en estudio el hecho que no consuma oxidante una vez reducido y el nivel de glucosa permanezca constante, indica que probablemente el % de glucosa obtenida provenga de uniones resistentes a la oxidación (1→3) o ramificadas. La diferencia entre el valor encontrado por cgl (7%) y en la determinación con glucosa oxidasa (4%) puede considerarse que se debe a que en la cgl, solo se consideraron áreas relativas, sin tener en cuenta las respuestas de cada uno de los standards utilizados.

TABLA 19

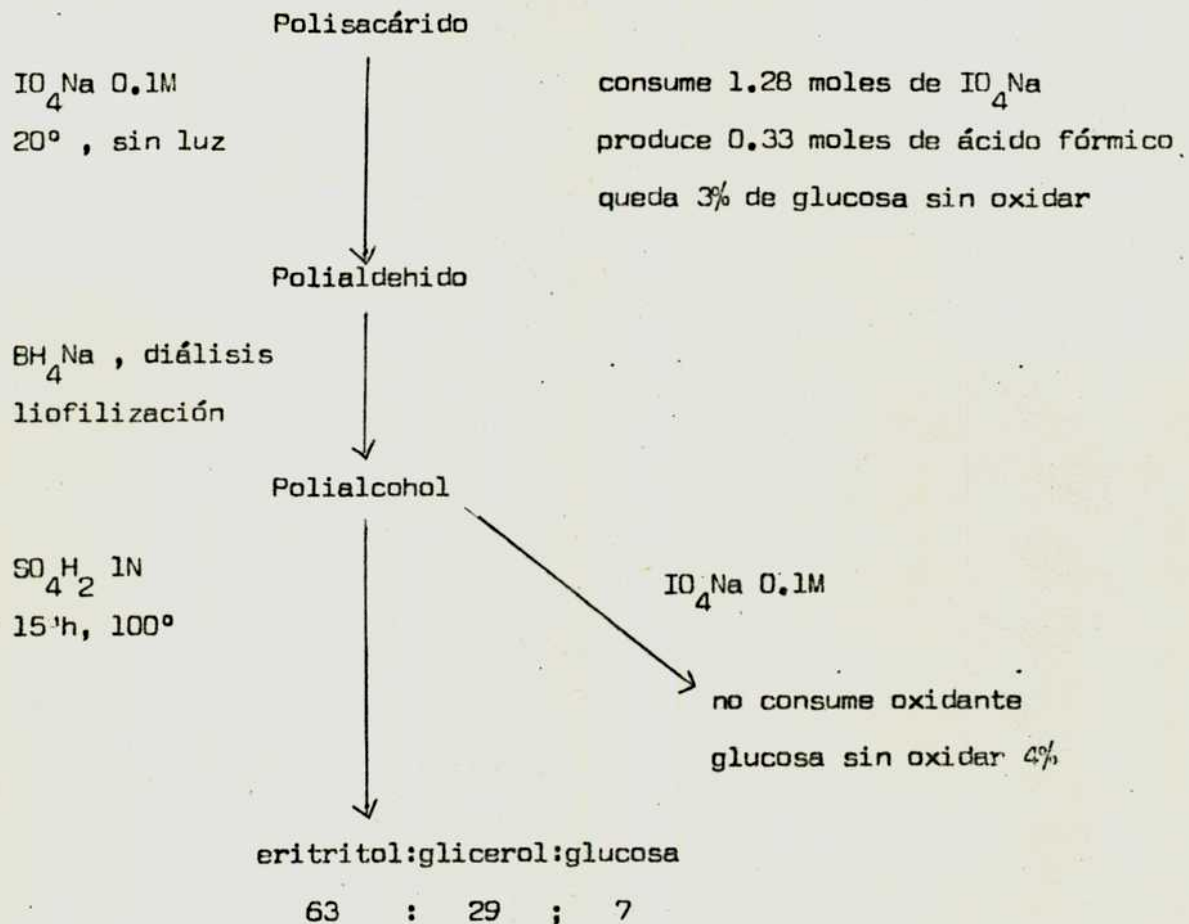
PORCENTAJE DE GLUCOSA RESISTENTE A LA OXIDACION CON IO_4^-
EN VARIOS GLUCANOS ESTUDIADOS

Glucano	Grado de ramificación ^(a)	% de residuos de D-glucosa resistentes
Amilosa	0.5	0.21
Amilopectina	2.1	0.72
Almidón soluble	5.9	1.9
Glucógeno	7.6	2.5

(a) determinado según la proporción de 2,3,4,6-tetra-O-Metil-D-glucosa encontrada por metilación total e hidrólisis del polisacárido.

ESQUEMA 12

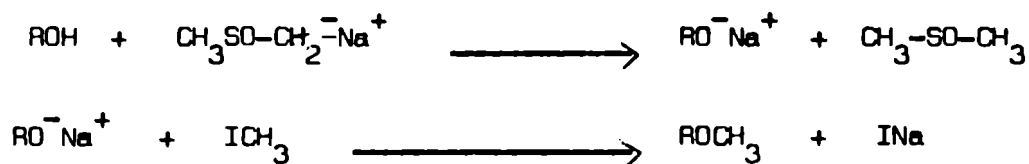
ESTUDIOS DE OXIDACION CON IO_4^- DEL POLISACARIDO



METILACION DEL POLISACARIDO

Se trató el polisacárido con hidruro de sodio, yoduro de metilo y dimetilsulfóxido según la técnica descrita por Hakomori (1964) y adaptada por Sandford y Conrad (1966) obteniéndose un producto con % OMe 36.48 y que presentaba aún una banda de absorción de OH en el espectro Infrarrojo. La repetición del procedimiento sobre el producto parcialmente metilado no dio resultados favorables aun cuando se cuidaron detalladamente las distintas condiciones experimentales (Temperatura de reacción, tiempo de reacción, basicidad del medio, etc), aislándose en todos los casos con bajo rendimiento, productos con % OMe entre 20-25%.

Con el método utilizado se genera el anión metilsulfinilo ($\text{CH}_3\text{-SO-CH}_2^-$) por reacción entre el hidruro de sodio y el dimetilsulfóxido de acuerdo al procedimiento descrito por Corey y Chaykovsky (1965). Este anión produce el alcóxido del polisacárido que reacciona con yoduro de metilo



El medio de reacción es así fuertemente alcalino. Sin embargo no se encontraron en la literatura antecedentes de la degradación de glucanos, aunque sí se observaron beta eliminaciones en polisacáridos que llevaban residuos de L-ramnosa terminales unidos a la posición 4 de ácidos glucurónicos (Anderson y col, 1967). En muchos trabajos de análisis de estructuras de polisacáridos se encuentra que, el producto parcialmente metilado obtenido por aplicación del método de Hakomori, se remetila según algún método clásico (OAg e ICH_3 ; OBa , Me_2SO e ICH_3)

El polisacárido parcialmente metilado se trató con OAg e ICH_3 (Purdie e Irvine, 1903) y el producto obtenido purificado por precipitación con éter de petróleo, tenía un %OMe de 39.72 y aún daba una banda de absorción en el IR de OH.

Siguiendo la técnica utilizada por Chanda y Percival (1950) para la purificación de un xilano metilado, se fraccionó el polisacárido metilado en mezcla de éter de petróleo-benceno. Una de las fracciones obtenidas presentaba un %OMe de 43.75 y no se observaba absorción correspondiente a OH en el IR. Las fracciones con %OMe 36.98 y 35.65 se remetilaron según el método de Purdie e Irvine y, al purificarlas por precipitación de su solución bencénica con éter de petróleo, se aisló un producto con %OMe 41.69

Los polisacáridos con %OMe 39.72 ; 41.6 y 43.75 se hidrolizaron disolviéndolos en ácido sulfúrico 66% a temperatura ambiente, diluyendo luego el ácido a 12% y calentando en baño de agua durante 8 horas.

Croon y col (1960) estudiaron la magnitud de demetilación y degradación de algunos azúcares metilados durante la hidrólisis ácida bajo distintas condiciones (Tabla 20)

TABLA 20

CONDICIONES ESTUDIADAS PARA LA HIDROLISIS DE POLISACARIDOS METILADOS

CONDICION	ACIDO	TEMPERATURA	TIEMPO
1.-	ClH 2% (aq)	100°	13 h
2.-	a) ClH 2% (MeOH)	100°	13 h
	b) ClH 0.5 N (aq)	100°	8 h
3.-	a) SO_4H_2 72%	25°	0.5 h
	b) SO_4H_2 12.4%	100°	4 h
4.-	a) HCOOH 98%	100°	6 h
	b) SO_4H_2 0.5N	100°	14 h

Observaron que bajo la condición 3 se obtenía el menor porcentaje de demetilación y alrededor de 3-6% de degradación. Las sustancias investigadas no mostraron demetilación selectiva y los %OCH₃ de las distintas posiciones parecían tener reactividades comparables.

Los azúcares parcialmente metilados obtenidos en la hidrólisis se identificaron por cromatografía en papel y cromatografía gas líquido (como alditoles sililados y alditoles acetilados) como 2,3,4,6-tetra-; 2,3,6-tri-; 2,3,4-tri-; 2,3-di- y posiblemente 2,6-di-O-metil glucosa.

La cromatografía gas líquido se realizó de acuerdo a una modificación del procedimiento introducido por Björndal y col (1967,a). Por los correspondientes espectros de masa, se confirmó la identidad de las glucosas parcialmente metiladas, luego de aislar los productos puros por cromatografía en una columna de celulosa. Se compararon dichos espectros con los obtenidos en las mismas condiciones de operación a partir de glucosas parcialmente metiladas de naturaleza conocida y con los datos de literatura. En todos los casos se controló la pureza de las fracciones obtenidas de la columna por cromatografía gas líquido.

Análisis de los espectros de masa

Para la obtención de los espectros de masa de las sustancias en estudio se transformó cada azúcar en el correspondiente alditol por reducción con BH_4Na . El producto reducido se acetiló con una mezcla de anhídrido acético:piridina (1:1)

Svensson y col (1967,b) hicieron un estudio de los distintos fragmentos obtenidos en el espectro de masas de hexitoles parcialmente metilados acetilados. Ellos obtuvieron sus resultados utilizando como temperatura de introducción de la muestra 150° . Sin embargo en nuestras experiencias se obtuvieron mejores resultados a 100° y temperatura ambiente. Lönngren y Svensson (1974) aclaran que diferencias entre distintos sistemas de introducción de muestras, pueden provocar diferencias considerables en los espectros.

Björndal y Svensson (1967,1970) y Axberg y col (1972) estudiaron detalladamente el modo de fragmentación de los acetatos de alditoles parcialmente metilados usando marcación con Deuterio.

Entre sus observaciones encontraron que el ion molecular no aparecía en ningún caso y que en la mayoría de los espectros el pico base era el de m/e 43 (CH_3O^+). Además los espectros de masas de los alditos isoméricos con el mismo modelo de sustitución no eran lo suficientemente distintos como para permitir una diferenciación entre ellos. Así, los alditos derivados de 2,3 y 3,4 - di - O - Metil - pentosas dan espectros de masas casi idénticos; lo mismo sucede con los provenientes de 2,4 y 3,5 - di - O - Metil - hexosas. También se observaba que para cada modelo de sustitución, se obtenía un espectro de masa único.

Chizov y col (1965) distinguen entre fragmentos primarios y secundarios. Los primarios provienen de una ruptura alfa entre dos átomos de carbono de la cadena del alditol. Los segundos se forman a partir de la eliminación de moléculas neutras de los fragmentos primarios, como ácido acético (masa 32), formaldehído (masa 30), cetona (masa 42), metanol (masa 32), etc.

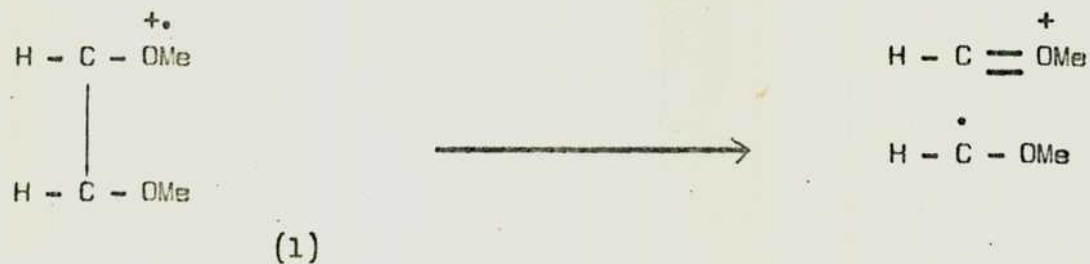
La intensidad de los picos depende de las condiciones experimentales utilizadas y en los primarios decrece al aumentar el Peso Molecular.

Björndal y Svensson (1970) supusieron que la carga del ion molecular obtenido de un acetato de alditol parcialmente metilado se localiza esencialmente en el O del éter (Estructuras 1 y 2, figura 28) y no en el O del grupo éster (3 y 4, fig 28). En concordancia con estas suposiciones, se encontró que las rupturas indicadas por 1 y 2 son mucho más significativas que las indicadas por 3 y 4. Además la ruptura 1 es más importante que la 2 dado que el radical metoxilo estabiliza mejor la carga que uno acetoxilo. Discutiremos luego una única excepción que se encontró a esta regla, lo cual se explica en base a otras suposiciones.

FIGURA 28

LOCALIZACION DE LA CARGA EN EL ION MOLECULAR DE ACETATOS DE ALDITOLES

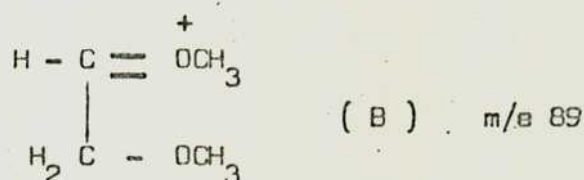
PARCIALMENTE METILADOS



El fragmento primario de menor masa m/e 45 (A) se encontró en sustancias que tienen un metoxilo en C-1 (o en 6-6 en hexitales)

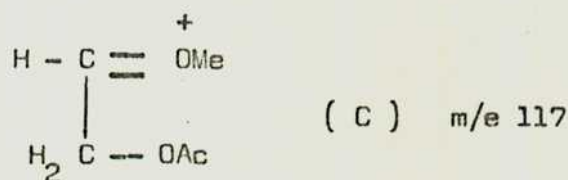


El fragmento primario B (m/e 89) se obtiene cuando hay metoxilos en carbono primario y secundario adyacentes, por ruptura entre el átomo de carbono metoxilado y el acetilado.

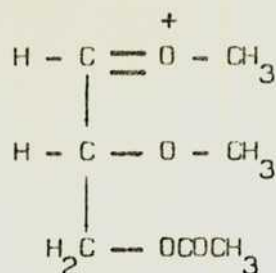


Esta ruptura está favorecida sobre aquella entre dos átomos de carbono metoxilados y ocurre significativamente solo en esta situación, reflejando la baja estabilidad del ion primario que se forma por ruptura entre C-5 y C-6. Además el ion que se forma está estabilizado por resonancia.

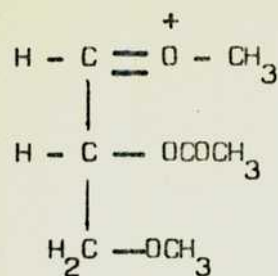
El fragmento primario C , m/e 117, se obtiene de derivados con un grupo acetoxilo en C-1 y un metoxilo en C-2 (2,3,4-tri-O-Me-1,5,6-tri-O-Acetil-glucitol, por ejemplo).



Se obtienen dos fragmentos primarios de m/e 161: F₁ y F₂ . F₁ se obtiene a partir de alditales metilados en C-2; C-3 y C-4 y F₂ de derivados metilados en C-1 C-3 y C-4 ó C-3; C-4 y C-6 (como ejemplo 3,4,6-tri-O-metil-1,2,5-tri-O-acetil-D-glucitol).

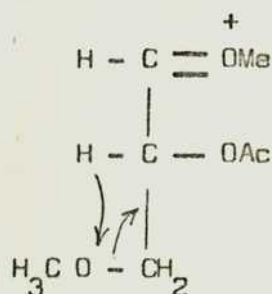


F_1

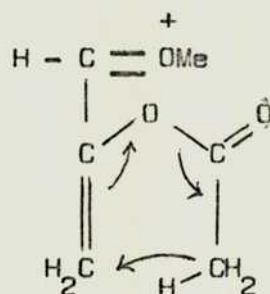
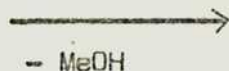


F_2

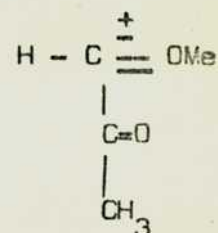
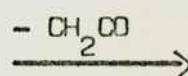
Cuando un metoxilo está en el Carbono beta al que lleva la carga formal, se produce pérdida de metanol; de acuerdo a esto el F_2 da el ion de m/e 129 (f_2) el cual por eliminación de ceteno da f'_2 de m/e 87



$F_2 (m/e 161)$



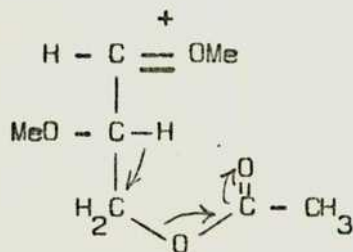
$f_2 (m/e 129)$



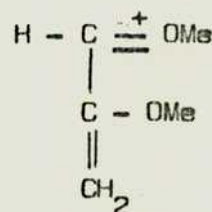
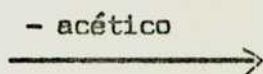
$f'_2 (m/e 87)$

No ocurre lo mismo con F_1 pues el metilo está en alfa respecto del que lleva la carga formal.

Cuando hay un acetoxilo en el Carbono beta respecto al catión, se elimina ácido acético. Esto sucede en F_1

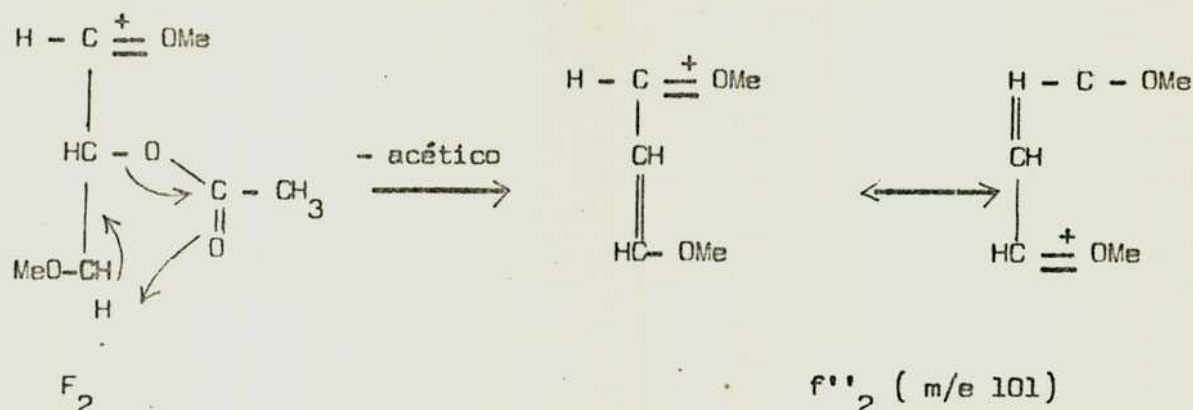


F_1



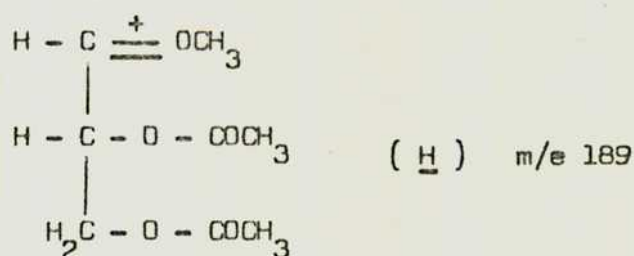
f_1

La eliminación de ácido acético a partir de F_2 está favorecida posiblemente por la resonancia del ion que se forma: f''_2



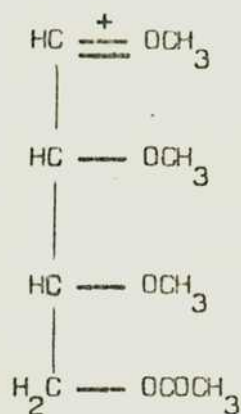
Se supone que por pérdida de formaldehído a partir de f_1 ó f_2 , se obtiene un fragmento secundario de m/e 71; pero el origen de este ion no pudo ser corroborado aún por los experimentos de marcación con Deuterio.

El fragmento primario H (m/e 189) deriva de alditoles acetilados en las posiciones 1 y 2 (ó 5 y 6) y metilados en 3 (ó 4), como 3,6-di-O-metil-1,2,4,5-tetra-O-acetil-D-glucitol.

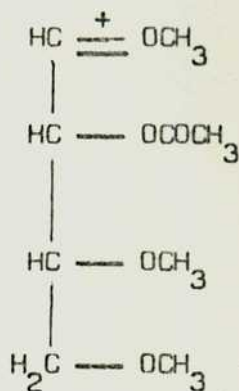


Por eliminación de ácido acético se obtiene h_1 (m/e 129). Teniendo en cuenta que el acético se elimina por un reordenamiento de Mac Lafferty y dado que cuando el alditol está monodeuterado en C-1, h_1 se desplaza hacia m/e 130, es el acetoxilo del C-1 el que se elimina. Entonces h_1 es idéntico a f_2 y por lo tanto se elimina cetena para dar h'_1 de m/e 87.

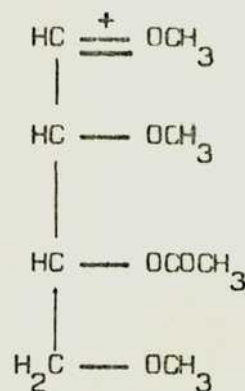
Hay tres fragmentos primarios de m/e 205. K_1 proviene de alditos metilados en las posiciones 3,4,5. K_2 de alditos metilados en 3,5,6 y K_3 de aquellos metilados en 3,4,6. En los tres casos si la posición 2 no está metilada se obtienen picos de muy baja intensidad o no aparecen.



K_1



K_2

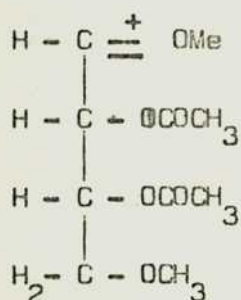


K_3

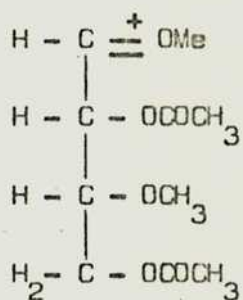
K_3 por eliminación de acético (acetoxilo en beta) da el fragmento k_1 , m/e 145 y esta es la única ruptura que se encontró para este catión.

K_2 produce los fragmentos secundarios k'_2 (m/e 173) y k_2 (m/e 145) por eliminación de metanol y ácido acético respectivamente. Como se ve el modelo de ruptura para K_3 y K_2 es análogo al de F_1 y F_2

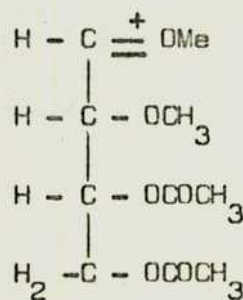
Tres fragmentos isoméricos de m/e 233 se han obtenido: L_1 ; L_2 y L_3



L_1

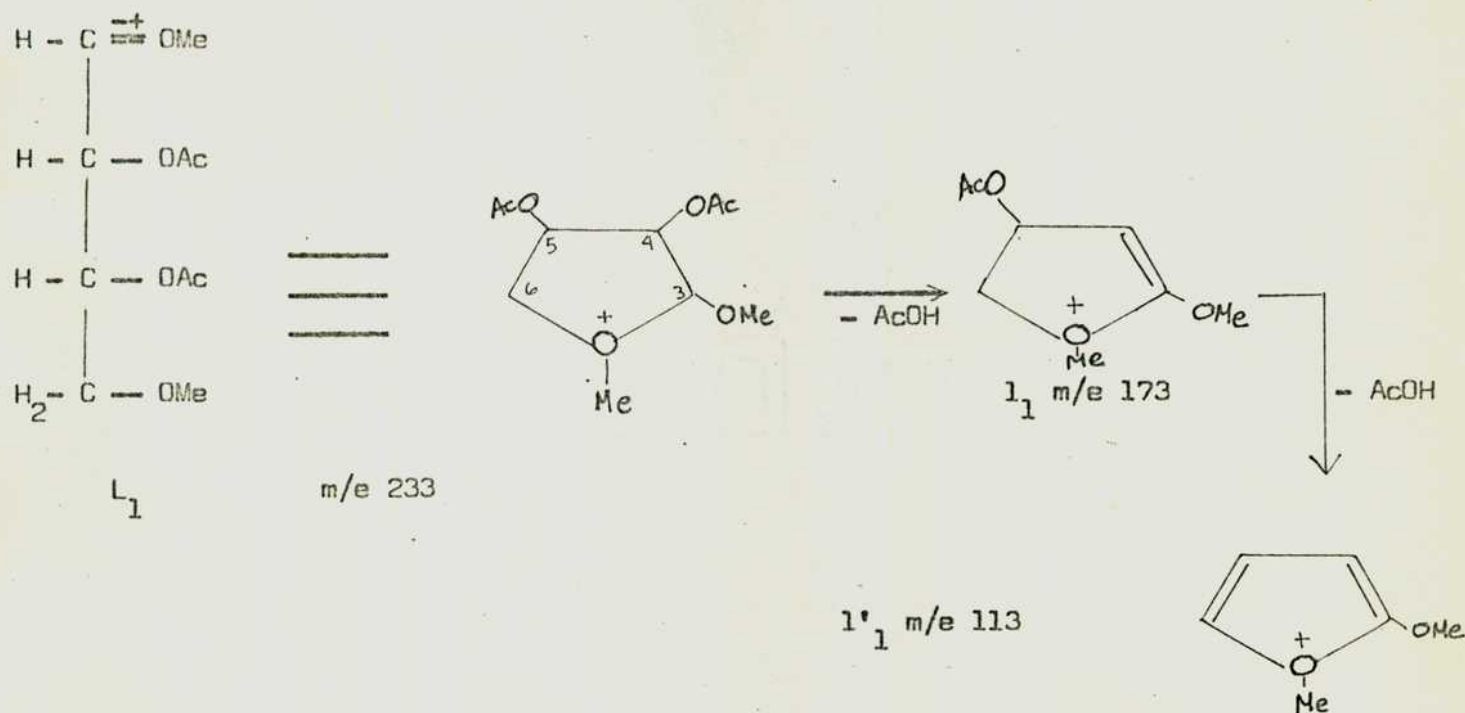


L_2

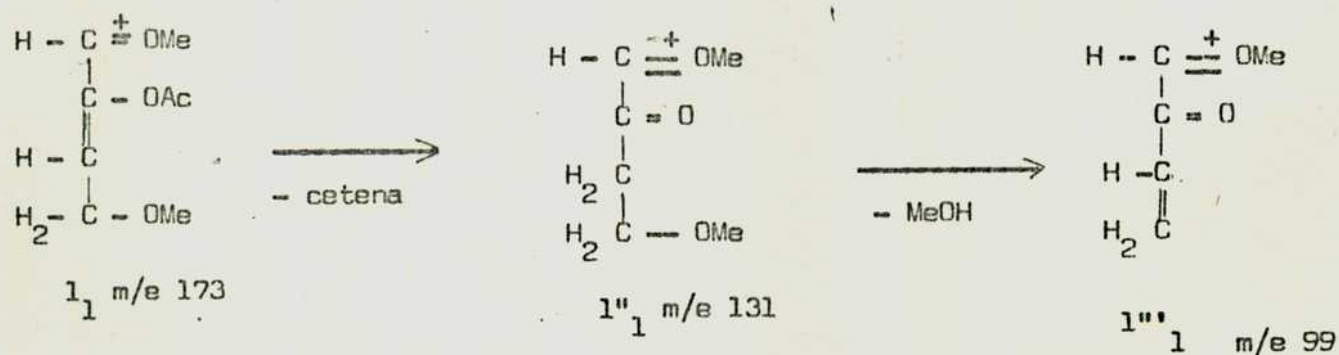


L_3

L_1 proviene de acetatos de hexitales metilados en las posiciones 2,3 y 6. La explicación de ciertos fragmentos secundarios es posible asumiendo que L_1 puede existir en forma cíclica. Esto se generaliza para todos los fragmentos primarios que tienen 4 ó más átomos de carbono en la cadena original (Axberg y Svensson, 1972)

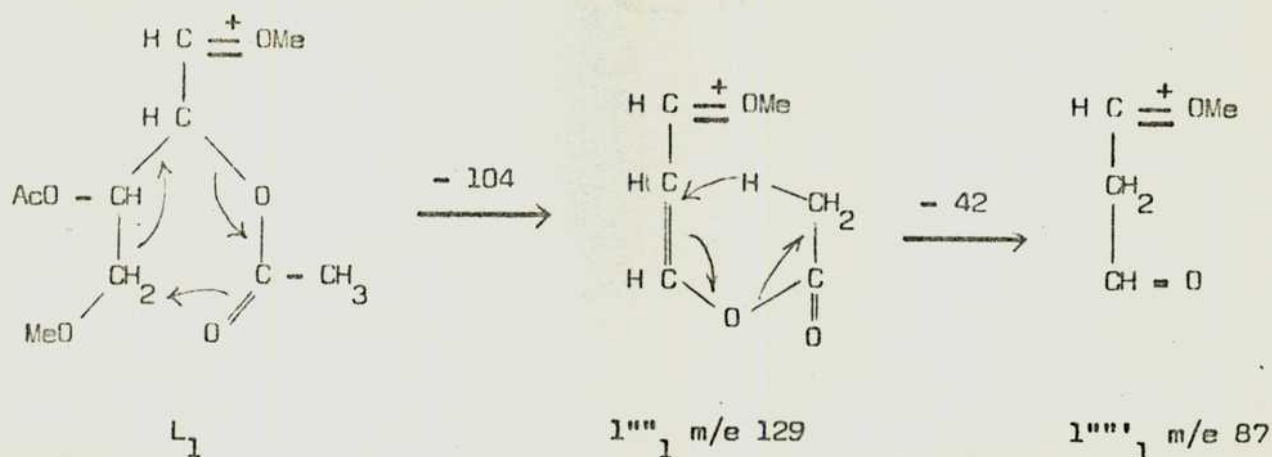


Otra ruptura alternativa no cíclica sería:

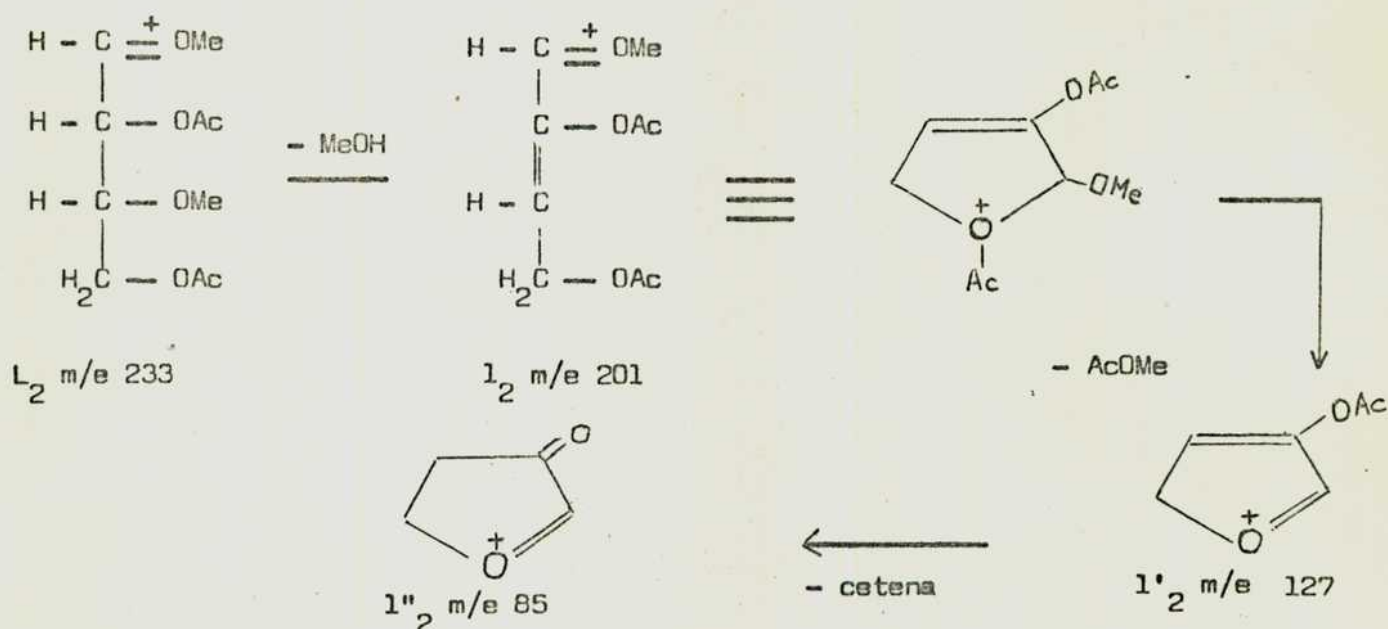


Ambas rutas han sido corroboradas por los experimentos de marcación con D.

Por eliminación sucesiva de acetato de metoximetilo y cetena a partir de L_1 se obtiene $1'''_1$ y $1''_1$



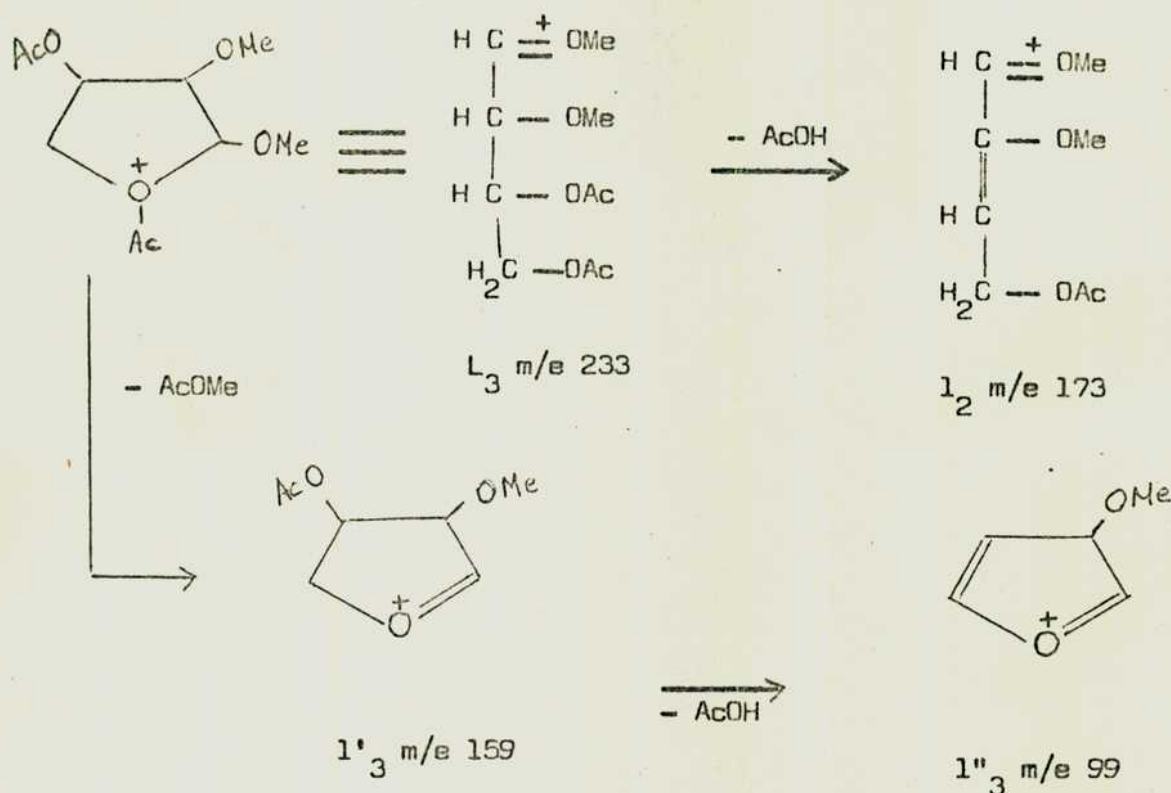
L_2 se forma a partir de alditoles 2,3,5 metilados. Por eliminación de metanol da 1_2 (m/e 201) el cual a través de un intermediario cíclico da $1'_2$ (m/e 127) por pérdida de acetato de metilo.



$1'_2$ podría explicarse también a partir de la pérdida consecutiva de metanol y cetena o viceversa, pero el hecho de no encontrar el ión 1_2 menos metanol ó 1_2 menos cetena hace que este proceso no sea probable.

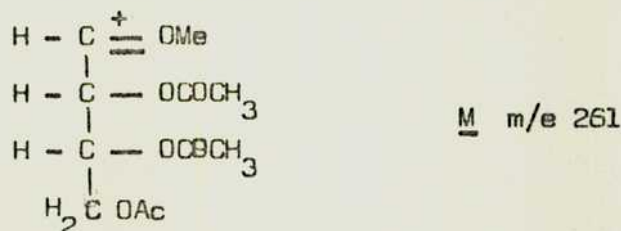
Aparece $1''_2$ por pérdida de ceteno y acético a partir de 1_2 (de forma similar a $1_1 \rightarrow 1''_1 \rightarrow 1'''_1$).

L_3 se obtiene de alditos 2,3,4 metilados. El tipo de ruptura que sufre sigue las mismas reglas que los fragmentos anteriores.



Los estudios de marcación con Deuterio revelaron que en todos los fragmentos provenientes de L_3 se retiene el metoxilo de C-4.

El pico primario de mayor masa encontrado M (m/e 261) e intensidad relativamente alta, se produce a partir de alditos metilados en la posición 3 y acetilados en 4,5,6 (ej 2,3-dimetil-1,4,5,6-tetra-O-acetil-D-glucitol).



Se pueden resumir las reacciones de ruptura que explican la aparición de los picos principales en los siguientes ítems:

- 1.- Eliminación de metanol o ácido acético de un metoxilo o un acetoxilo en beta respecto al catión
- 2.- Eliminación de acético de un acetoxilo en alfa respecto al catión y también eliminación de acetato de metoximetilo
- 3.- A través de estas eliminaciones se producen dobles uniones y si el acetoxilo está unido a un átomo de carbono no saturado, se elimina ceteno con formación de un grupo carbonilo. Nunca se elimina ceteno directamente de un ion primario.
- 4.- Se elimina metanol y acético cuando hay metoxilos o acetoxilos respectivamente en beta respecto a un carbonilo.
- 5.- No es usual la eliminación de formaldehído
- 6.- Algunas fragmentaciones proceden a través de iones cíclicos.

Estos diferentes mecanismos de fragmentación deben examinarse como suposiciones razonables que permiten racionalizar las fragmentaciones observadas. Podemos ver que explican bien los picos importantes que aparecen en los espectros de los glucitales parcialmente metilados acetilados, que se resumen en las Tabla 20^a, 21, 22, 23 y 24. Los iones marcados con asteriscos son los que se pueden racionalizar a través de las rupturas vistas anteriormente.

Determinación cuantitativa de los azúcares parcialmente metilados

La determinación cuantitativa de los productos obtenidos por hidrólisis del polisacárido metilado se llevó a cabo midiendo las áreas relativas de sus picos en cgl (OV-101 3%, TMS éteres). No se usó para estos fines los correspondientes acetatos pues en OV-101 la separación entre los picos no era apta para permitir una correcta medición y en NPGS los productos acetilados eran fuertemente retenidos por la columna apareciendo como picos muy anchos.

TABLA 20'

ESPECTROS DE MASA DE GLUCITOLIOS ACETILADOS PARCIALMENTE METILADOS, PICOS IMPORTANTES

Azúcar	43	45	59	71	85	87	99	101	113	115	117	129	145	161	189	205	233	261
	m/e																	
2,3-dimetil-glucitol	+							+			+	+						+
2,4-dimetil-glucitol	+					+					+	+			+			
2,6-dimetil-glucitol	+					+					+	+						
3,6-dimetil-glucitol	+	+				+	+		+			+			+		+	
4,6-dimetil-glucitol	+	+				+		+				+		+				+
2,3,4-trimetil-glucitol	+					+	+	+	+		+	+		+	+			
2,3,6-trimetil-glucitol	+	+				+	+	+	+		+						+	
2,4,6-trimetil-glucitol	+	+				+		+	+		+	+		+				
3,4,6-trimetil-glucitol	+	+				+		+	+			+	+	+	+			
2,3,4,6-tetrametil-glucitol	+	+				+	+	+	+		+	+	+	+		+		

Björndal Y Svensson (1967)

Tº introducción 250º

Tº de la fuente de iones 290º

Potencial de ionización 70 eV

Corriente de ionización 60 microamperes

TABLA 21

Fracción de masa de 2,3,6-tri-O-metil-1,4,5-tri-O-Acetil-D-glucitol y

Fracción 8 de la columna de metilados

	2,3,6-tri-O-metil				fracción 8			
	m/e	%	m/e	%	m/e	%	m/e	%
T° introducción	* 43	100	* 117	80	43	100	117	61
25°C	* 45	16	* 129	14	45	19	129	11
	85	9	131	12	85	7	131	8
	* 87	20	161	6	87	17	161	6
	* 99	24	* 173	4	99	19	173	5
	* 101	16	* 233	32	101	18	233	21
	* 113	36			113	29		
T° introducción	43	100	87	17	43	100	117	50
100 °C	45	12	99	20	45	16	129	8
	55	17	101	21	87	15	131	7
	57	21	113	29	99	16	161	4
	69	17	117	58	101	17	173	4
	71	18	129	12	113	24	233	16
	83	14	131	10				
	85	12	173	9				
			233	17				
T° introducción	43	100	95	11	43	100	113	18
150 °C	45	8	97	15	45	15	117	35
	55	18	99	6	87	12	169	10
	57	21	101	12	99	16	173	6
	69	18	105	22	101	13	211	5
	71	20	109	22			233	10
	81	11	113	11				
	83	18	117	25				
	85	13	169	35				
			211	25				
Según Axberg y	* 43	100	* 113	28				
Svensson (1972)	* 45	20	* 117	50				
	59	9	* 129	9				
	85	6	131	9				
	* 87	17	161	5				
	* 99	16	* 173	7				
	* 101	20	* 233	16				

TABLA 22

Espectros de masas de 2,3,4-tri-O-Metil-1,5,6-tri-O-Acetil-D-glucitol y

Fracción 7 segunda columna de metilados

	2,3,4-tri-O-metil				fracción 7			
	m/e	%	m/e	%	m/e	%	m/e	%
T° introducción	* 43	100	* 99	26	43	100	87	20
25°C	55	16	* 101	50	55	20	99	25
	57	26	* 117	40	57	21	101	64
	69	16	* 129	26	69	15	117	45
	* 71	20	* 161	13	71	20	129	25
	* 87	23	* 189	7	83	16	161	13
					85	18	189	8
T° introducción	23	100	71	19	43	100	88	15
100 °C	43	91	99	13	55	10	99	14
	45	20	101	12	57	125	101	12
	55	17	105	44	69	14	117	30
	57	26	117	12	71	18	119	15
	60	20	129	9	85	12	129	18
ε	69	16	161	5	87	13	161	8
Datos de Axberg	* 43	100	* 117	32				
y Svensson (1972)	45	11	* 129	24				
	* 87	21	* 161	11				
	88	9	171	4				
	* 99	26	* 189	8				
	* 101	45	* 233	4				
	102	5						

TABLA 23

Espectros de masas de 2,3-di-O-etil-1,4,5,6-tetra-O-Acetil-D-glucitol

y de la fracción 9—16 de la columna de metilados

	2,3 - di-metil				fracción 9 — 16			
	m/e	%	m/e	%	m/e	%	m/e	%
Tº introducción.	*43	100	101	17	43	60	95	32
25°C	55	52	105	84	55	53	97	44
	57	89	109	31	57	100	107	21
	69	40	111	35	69	52	109	28
	71	60	*117	58	71	64	111	12
	77	62	122	63	81	32	129	18
	81	40	123	30	83	46	191	8
	83	43	125	26	85	38		
	85	42	127	15				
	87	15	129	13				
	95	41	191	26				
	97	50	*261	8				
<hr/>								
Tº introducción	*43	84	101	11	43	94	87	31
100°C	55	40	105	100	55	81	95	39
	57	77	109	16	57	100	97	30
	69	40	111	26	67	31	109	25
	71	51	117	32	69	62	111	18
	77	50	122	50	71	50	122	25
	81	26	125	16	83	43	191	12
	83	36	127	10	85	44	261	5
	85	33	129	7				
	95	26	191	7				
	97	40	261	5				

TABLA 24

Espectros de masas de 2,3,4,6-tetra-O-Metil-1,5-di-O-Acetil-D-glucitol y

fracciones 1— 3 de la columna de metilados

	2,3,4,6-tetra-metil				fracción 1→ 3			
	m/e	%	m/e	%	m/e	%	m/e	%
Tº introducción	*43	100	* 101	64	43	100	113	15
25°C	*45	64	102	18	45	20	117	46
	59	25	113	11	71	8	129	13
	*71	25	* 117	22	87	15	131	6
	75	20	* 129	33	99	19	161	8
	* 87	32	131	9				
	88	10	* 145	30				
	89	20	* 161	26				
			* 205	10				
<hr/>								
Tº introducción	43	100	102	12	43	100	113	13
100°C	45	65	105	70	45	20	117	32
	71	25	117	20	71	8	129	10
	87	30	129	27	87	15	131	4
	89	17	145	25	99	13	161	4
	101	52	161	17	101	21		
			205	5				
<hr/>								
Tº introducción	43	100	102	10	43	100	113	11
150°C	45	63	105	50	45	19	117	30
	57	26	117	23	71	7	129	15
	71	23	129	19	87	13	131	4
	87	26	145	23	99	15	161	5
	89	19	161	13	101	23		
	101	47	205	5				
<hr/>								
Datos de Björndal y Svensson (1970)	* 43	100	102	7				
	* 45	36	* 117	34				
	59	4	* 129	32				
	* 87	15	130	3				
	88	6	131	4				
	89	6	* 145	28				
	99	4	* 161	31				

Los resultados obtenidos están en la Tabla 25 y son promedio de 5 corridas realizadas en las mismas condiciones.

Tabla 25

Glucosa metilada	Relación molar		
	Polis. %DMe 39.72	Ps %DMe 41.6	Ps %DMe 43.75
2,3,4,6-tetra-O-metil	-	1	2
2,3,6-tri-O-metil	48	56	63
2,3,4-tri-O-metil	24	27	26
2,3-di-O-metil	17	6.8	5
2,6- ó 3,6-di-O-metil	8	8.1	4
monometil?	3	1	-

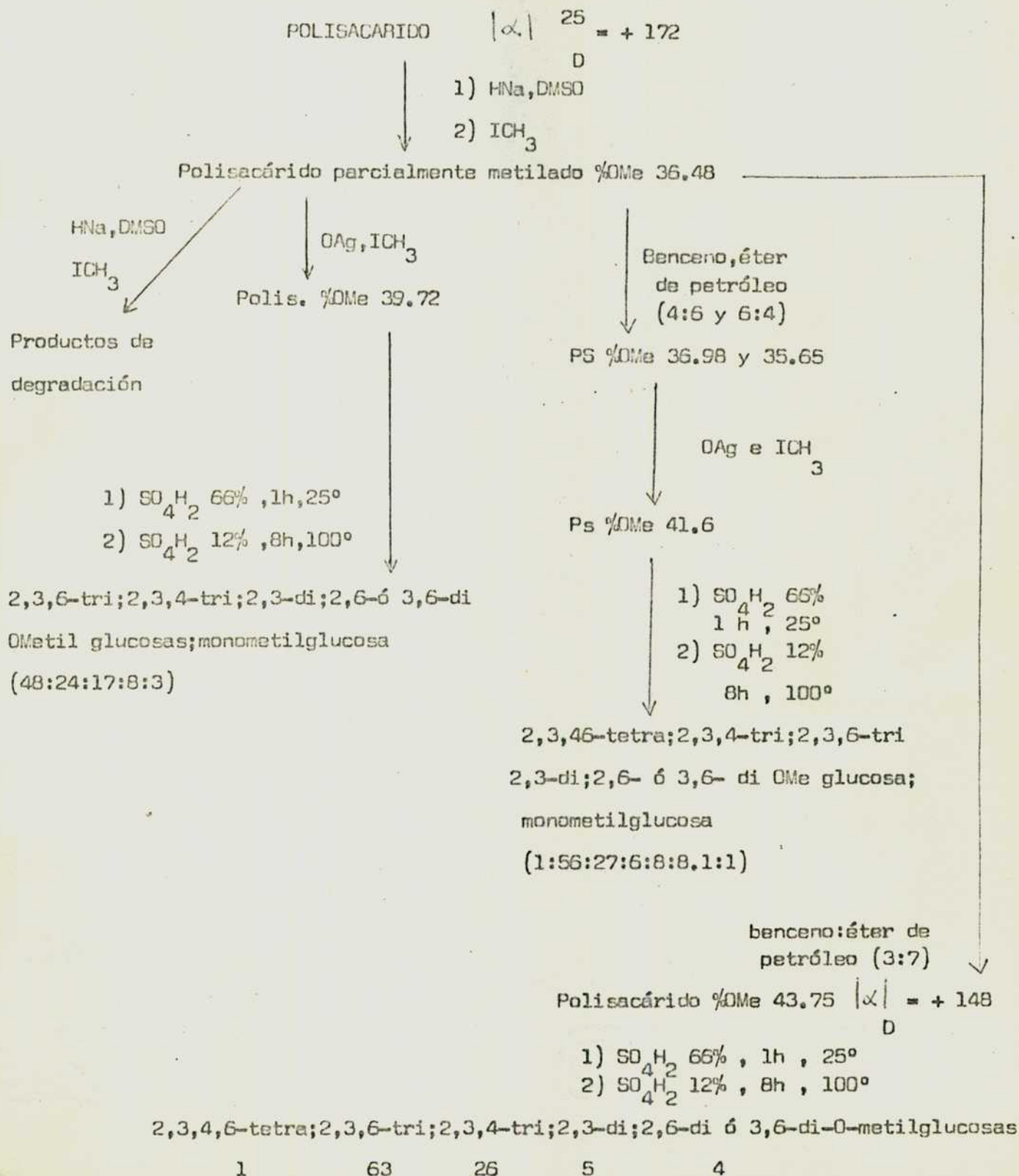
Como se observa en el producto que se considera totalmente metilado, el porcentaje de dimetilglucosas (9%) es mucho mayor que la tetrametilglucosa (2%). Esto indica que puede haber un 2% de ramificaciones en el glucano. El exceso de productos dimetilados podría deberse a una demetilación en las condiciones de hidrólisis o a un defecto en la metilación del polisacárido.

Al respecto es interesante notar que una disminución de 2% en el porcentaje de metilación provoca un ascenso de 9 a 14.9% en la cantidad de productos dimetilados apareciendo inclusive 1% de un producto monometilado; por lo tanto el exceso de glucosas dimetiladas respecto de la tetrametilglucosa, podría deberse a una sub metilación (%DMe teórico 45.5%). También es de destacar que la 2,3,6 trimetil es la que más resistencia opone a la entrada de metoxilos. Esto concuerda con el hecho que se haya encontrado 2,3-dimetil y posiblemente 2,6-dimetil-glucosas.

Norrman y col (1968) estudiaron la reactividad de los OH de C_2 , C_3 y C_4 , durante la metilación parcial de un dextrano y encontraron que en general el OH en C-2 tiene mayor reactividad que el OH en C-3. Leonard y Richards (1975) estudiando un dextrano aislado de caña de azúcar, encontraron que su metilación total era dificultosa. Paralelamente encontraron resultados anormalmente bajos en la oxidación con IO_4^-

ESQUEMA 13

ESTUDIOS DE METILACION DEL POLISACARIDO



CAPITULO VI

P A R T E E X P E R I M E N T A L

CONSIDERACIONES GENERALES

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Kofler y no están corregidos.

Las evaporaciones se realizaron a presión reducida y en baño de agua termotatizado cuya temperatura estaba entre 40° y 60° según los casos.

Los poderes rotatorios fueron medidos en un polarímetro automático Perkin Elmer modelo 141 a temperatura ambiente con lámpara de Na (589 nm).

Las determinaciones colorimétricas se realizaron con un espectrofotómetro Beckman DU. Los espectros de absorción en el infrarrojo fueron determinados en un espectrofotómetro Perkin Elmer 421. Los espectros de resonancia magnética nuclear se determinaron con un espectrómetro Varian A-60, usando tetrametilsilano cuando se utilizó Cl_3CD como solvente y 3-(trimetilsilil)propanosulfonato de Na, cuando se utilizó D_2O .

Los microanálisis fueron efectuados por la doctora Blanca Berinzaghi de Deferrari en el laboratorio de microanálisis de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

MÉTODOS CROMATOGRAFICOS

Las cromatografías sobre papel se realizaron por el método descendente empleando papel Whatmann N° 1 para las cromatografías analíticas y papel Whatmann N° 3 para las preparativas.

Para las cromatografías en capa delgada se utilizó silica gel G (Merck), como fase fija.

Solventes:

- 1) n-butanol, piridina, agua (6:4:3, en vol)
- 2) n-butanol, etanol, agua (10:4:4, en vol)
- 3) acetato de etilo, ácido acético, ácido fórmico, agua (18:3:1:4, en vol)

- 4) piridina, acetato de etilo, ácido acético, agua (5:5:1:3, en vol)
- 5) acetato de etilo, piridina, agua (2:1:2, en vol, capa superior)
- 6) butanona, agua (95:5, en vol)
- 7) butanona saturada con agua
- 8) acetato de etilo, benceno (1:1, en vol)
- 9) n-butanol, etanol, agua (4:1:5, en vol, capa superior)
- 10) n-butanol, etanol, agua (10:1:2, en vol)
- 11) ácido fórmico, t-butanol, butanona, agua (15:25:35:25, en vol)

Reactivos para revelado

a) Nitrato de plata-hidróxido de sodio

Preparado según la técnica descrita por Trevelyan y col (1950). Se agregaron 0.1 ml de una solución acuosa saturada de nitrato de plata en 20 ml de acetona. El precipitado de nitrato de plata obtenido se redisolvió por agregado de la mínima cantidad de agua. Los cromatogramas se sumergieron en la solución anterior y se secaron a temperatura ambiente. Después de 3-4 minutos se pulverizaron con una solución de hidróxido de sodio 0.5 N en etanol 50%.

Los azúcares reductores y polialcoholes aparecen como manchas marrón oscuro. Las manchas obtenidas se fijaron por inmersión en una solución acuosa de tiosulfato de sodio 5%. La cantidad mínima detectada de azúcares reductores es de 2-20 μ g.

b) Biftalato de anilina

Se preparó según la técnica descrita por Wilson (1959). Se disolvieron 1.66 g de ácido ftálico y 0.91 g de anilina (destilada sobre Zn) en una mezcla formada por 48 ml de n-butanol, 48 ml de éter etílico y 4 ml de agua. El reactivo es estable por dos semanas, guardado en heladera.

Se sumergieron los cromatogramas en el reactivo, se secaron a temperatura ambiente y se revelaron calentando en estufa a 105° durante 10 minutos. Los disacáridos reductores y aldohexosas dan manchas color marrón, mientras que las aldopentosas presentan un color rosado.

c) Clorhidrato de p-anisidina

Preparado según la técnica de Hough y col (1950). Se pulverizaron los cromatogramas con una solución de clorhidrato de p-anisidina (3-4%, peso/volumen) en n-butanol, etanol, agua (4:1:1, en vol). Se agregaron a la solución anterior trazas de cloruro estannoso. Los cromatogramas se secaron a temperatura ambiente y se revelaron calentando en estufa a 100-120° durante 10 minutos. Las aldopentosas dan color rosado; los ácidos urónicos, marrón rojizo; las aldohexosas, marrón y las hexulosas, amarillo. Se detectan 1-5 µg del azúcar reductor.

d) Clorhidrato de p-anisidina (para determinaciones cuantitativas)

Se preparó según la técnica de Pridham (1956). Se disolvió 1 g de clorhidrato de p-anisidina cristalina en 10 ml de metanol absoluto y se llevó a 100 ml con n-butanol. Se añadió 0.1 g de hidrosulfito de sodio. La solución se guardó en heladera. Se pulverizaron los cromatogramas con este reactivo, se secaron a temperatura ambiente y se calentaron en estufa a 130° durante 10 minutos. Las manchas que se observan son de las mismas características que con el reactivo c. La absorción de los complejos p-anisidina azúcar, es directamente proporcional al peso de azúcar dentro de un rango de 5 % a 50 %.

e) Reactivo para cetosas

Resorcinol-ácido clorhídrico

Se preparó según la técnica descripta por Hough y col (1950). Se pulverizaron los cromatogramas con una solución 1:1 de resorcinol 1% en n-butanol y ácido clorhídrico 0.25 N. Esta solución se preparó en el momento de ser utilizada. Se dejaron secar los cromatogramas a temperatura ambiente y se revelaron por calentamiento en estufa a 80° durante 10 minutos. Las cetoheptosas o disacáridos que las contienen dan un color rojo característico. Las aldosas no se revelan en estas condiciones.

f) Reactivo para ácidos

Sulfanilamida-β-naftol-nitrito de sodio

Preparado según la técnica descripta por Schmidt y col (1963). Se pulverizaron los cromatogramas con una solución de 2g de sulfanilamida y 0.5g de 3 naftol en 100 ml de etanol 95%. Se secaron a temperatura ambiente y se pulverizaron con una solución recientemente preparada de nitrito de sodio 1% en agua. Los ácidos aparecen como manchas anaranjadas cuando están en concentración apreciable.

g) Reactivo para lactonas

Hidroxilamina-cloruro férrico

Preparado según la técnica descripta por Abdel-Akher y Smith (1951). Se pulverizaron los cromatogramas con una solución recién preparada de volúmenes iguales de clorhidrato de hidroxilamina 1N y KOH 1N, ambas en metanol. Se secaron a temperatura ambiente y se pulverizaron con una solución de cloruro férrico 1-2% en ácido clorhídrico 1%. Las lactonas aparecen como manchas de color violeta.

CROMATOGRAFIA GAS LIQUIDO

Se realizaron en un cromatógrafo Hewlett-Packard 5750 con detector de ionización a llama. Las columnas utilizadas eran de acero (183 x 0.3 cm) y contenían las siguientes fases:

- i) neopentilglicolsuccinato (NPGS) 10% sobre Chromosorb G (HP), malla 100-120
- ii) OV-17 3% sobre Chromosorb W (HP) , malla 80-100
- iii) OV-101 3% sobre Chromosorb W (AW/DMCS) , malla 60-80
- iv) SE 30 3% sobre chromosorb W (AW/DMCS) , malla 60-80
- v) OV-1 3% sobre Chromosorb W (AW/DMCS), malla 60-80

CRONATOGRAFIA SUPERFICIES

Se realizó en una columna de 30 cm de largo por 1 cm de diámetro. Se utilizó Sephadex G-10.

La columna se preparó suspendiendo 10 g de Sephadex G-10 en 100 ml de agua destilada, agitando durante dos horas. Se decantó el sobrenadante junto con partículas muy finas del gel que quedaron en suspensión y se repitió toda la operación una vez más. Se llenó la columna con el gel embebido en agua y se procedió a la separación.

El eluyente usado en todos los casos fue agua destilada.

PREPARACION DE TRIMETILSILILETERES

Se procedió de acuerdo a la técnica descripta por Swesly y col. La muestra (10 mg) secada durante dos horas a 60°/5 mm sobre pentóxido de fósforo se tomó en piridina anhidra (1 ml), agitando durante aproximadamente 15 minutos en un baño de agua a 70° para ayudar la disolución total de la misma. Se agregaron hexametildisilano (0.2 ml) y trimetilclorosilano (0.1 ml). Se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó y tomó el sobrenadante para proceder al análisis por cromatografía gas líquido.

PREPARACION DE ACETATOS (Para cromatografía gas líquido)

La muestra (10 mg) secada durante dos horas a 60°/5 mm sobre pentóxido de fósforo, se trató con anhídrido acético, piridina (1:1, en vol) (1 ml). Se calentó durante una hora a reflujo en un baño de agua a 70° y se dejó una hora a temperatura ambiente. Se tomó el producto con agua, se llevó a seco a presión reducida y se tomó el residuo con diclorometano analítico para proceder a su análisis por cromatografía gas líquido.

DETERMINACION DE GLUCOSA

REACTIVO DE GLUCOSA OXIDASA - PEROXIDASA

Se usó para la determinación selectiva y cuantitativa de glucosa según la técnica de Fleming y Pegler (1963). Se disolvieron 60 mg de glucosa oxidasa, 6 mg de peroxidasa (94U/mg) y 20 mg de O-dianisidina en 200 ml de buffer tris pH 7.0. Este buffer se preparó disolviendo 15.25 g de 2-amino-2-(hidroximetil)propano-1,3 diol en 21.5 ml de ácido clorhídrico 5N, se diluyó a 250 ml en matraz aforado con agua destilada, se agregaron 165 ml de glicerol analítico y se ajustó a pH 7.0 con un pHmetro marca Methrom Herisau, modelo E 396 B. El reactivo es estable a 4°C en frasco oscuro durante 3-4 semanas.

Técnica general

Se mezclaron 2 ml del reactivo glucosa oxidasa-peroxidasa con 1 ml de la solución de glucosa (0-100 μ g). Se incubó una hora a 25°. Se agregaron 4 ml de ácido sulfúrico concentrado analítico y se determinó la absorbancia a 525 nm. Se usó como standard una solución de glucosa 10^{-3} M.

DETERMINACION DE AZUCARES REDUCTORES

METODO COLORIMETRICO DE FENOL SULFURICO

Se procedió de acuerdo a la técnica descrita por Smith y col (1956). Se mezcló 1 ml de una solución conteniendo entre 10 y 70 γ del azúcar con 1 ml de una solución de fenol 5% (el fenol se redistiló, previamente bajo corriente de N_2). Se agitó. Se agregaron 5 ml de ácido sulfúrico 96% analítico con una pipeta de punta ancha, agitando durante la adición. Luego de 10 minutos se agitaron los tubos nuevamente y se dejaron reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Apareció un color amarillo naranja. Se midió la absorción a 490 nm para hexosas y hexosas metiladas, y a 480 nm para pentosas, ácidos urónicos y sus derivados metilados.

METODO COLORIMETRICO DE SOMOGY NELSON (1945)

Se utiliza para determinar entre 0.01 y 3.0 mg de glucosa (u otros azúcares de poder reductor equivalente)

Reactivos

a) Se disolvieron 7 g de fosfato disódico anhidro y 10 g de tartrato de sodio y potasio en 175 ml de agua. Se agregaron 25 ml de hidróxido de sodio 1N y luego, con agitación, 20 ml de una solución 10% de sulfato cúprico. Se agregaron 45 g de sulfato de sodio y se llevó a 250 ml en matraz aforado. Se dejó reposar uno o dos días y se usó la parte superior clara.

b) Se disolvieron 8.3 g de molibdato de amonio en 150 ml de agua y se agregaron 7 ml de ácido sulfúrico 96% analítico. A esta solución se agregó 1 g de arseniato disódico en 80 ml de agua. Se mezcló y se colocó a 37°. Se usó luego de transcurridas 48 horas.

Técnica

Se tomó 1 ml del reactivo a y 1 ml de la solución del azúcar. Se calentó en un baño de agua hirviendo durante 10 minutos. Se enfrió a temperatura ambiente y se agregaron 0.5 ml del reactivo b. Se llevó a volumen de 10 ml, se mezcló y midió la absorbancia a 520 nm.

O X I D A C I O N E S C O N P E R I O D A T O D E S O D I O

TECNICA GENERAL

Se colocó en matraz aforado una solución de metaperiodato de sodio 0.1 M (cuatro veces el consumo esperado) y el polisacárido en una concentración del 0.1%, llevando a volumen con agua destilada. La oxidación se llevó a cabo a temperatura ambiente en ausencia de luz. Se midió, a distintos intervalos de tiempo, el consumo de periodato y la producción de ácido fórmico así como la proporción de glucosa inalterada, hasta que se observó constancia en el consumo de oxidante y/o sobreoxidación. Paralelamente, se realizó un blanco libre de azúcar en las mismas condiciones.

DETERMINACION DEL CONSUMO DE PERIODATO

Se empleó un método volumétrico basado en la técnica de Fleury y Lange (1933)

Soluciones

Solución de trióxido de arsénico 0.1 N (0.025 M)

Se pesaron 2.474 g de trióxido de arsénico, se transfirieron a un vaso de precipitados de 400 ml y se disolvieron en una solución concentrada de OHNa (2 g de OHNa en 20 ml de agua). Se diluyó a 200 ml y se neutralizó con ácido clorhídrico 1N hasta reacción débilmente ácida (pH 5-6). Se agregaron 2 g de bicarbonato de sodio y la solución se transfirió cuantitativamente a un matraz aforado de 500 ml, llevándose a volumen.

Solución de trióxido de arsénico 0.01N

Se preparó por dilución de la solución anterior

Solución de iodo 0.1 N

Se agregaron 3.125 g de iodo bisublimado a una solución de 10 g de IK en 10 ml de agua. Se agitó hasta disolución total y se llevó a volumen en un matraz aforado de 250 ml

Solución de iodo 0.01 N

Se preparó por dilución de la solución anterior

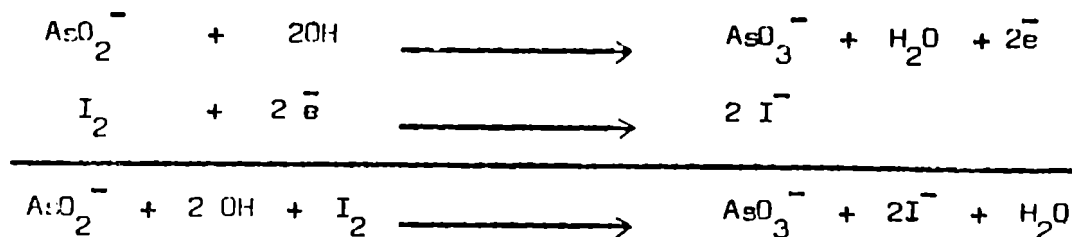
Solución de yoduro de potasio 20%

Solución saturada de bicarbonato de sodio

Valoración de las soluciones

Solución de trióxido de arsénico 0.1 N: se considera patrón

Solución de iodo 0.1 N: 1 ml de la solución patrón de trióxido de arsénico 0.1N, se tituló con la solución de iodo, usando almidón como indicador. La ecuación de óxido-reducción correspondiente es:



$$f_{\text{I}_2} = \frac{V_a}{V_b} = \frac{\text{volumen de la solución de trióxido de arsénico}}{\text{volumen de la solución de iodo utilizada en la titulación}}$$

PROCEDIMIENTO

Se extrajeron alícuotas de la mezcla de oxidación que se agregaron a una solución de 5 ml de trióxido de arsénico 0.01 N, 1 ml de solución saturada de bicarbonato de sodio y 0.2 ml de yoduro de potasio 20%. Se dejó una hora en la oscuridad y se tituló el exceso de arsenito de sodio con la solución de iodo 0.01 N, empleando almidón como indicador. De manera idéntica se procedió con el blanco. Se calculó el periodato consumido según las siguientes ecuaciones:

$$5 \times 0.01 - a \times 0.01 \times f_{\text{I}_2} = c = \text{meq de IO}_4^- \text{ presentes en el blanco}$$

$$5 \times 0.01 - b \times 0.01 \times f_{\text{I}_2} = d = \text{meq de IO}_4^- \text{ presentes en la muestra}$$

$$c - d = e = \text{meq de IO}_4^- \text{ consumidos}$$

$$e/2 = \text{milimoles de IO}_4^- \text{ consumidos}$$

Donde a = ml de iodo consumidos por el blanco

b = ml de iodo consumidos por la muestra

De ahí surge que, si V es el volumen de la mezcla de oxidación y A es la alícuota tomada para titular, el número de moles totales de IO_4^- consumidos será:

$$\frac{e}{2} \times \frac{V}{A} \times 10^{-3}$$

DETERMINACION DE LA PRODUCCION DE ACIDO FORMICO

Soluciones necesarias

Solución de hidróxido de sodio 0.01 N:

Se preparó por dilución de una solución de 25 g de hidróxido de sodio en 25 ml de agua destilada; 0.65 ml de esta solución se llevaron a 1 litro en matraz aforado. Se tituló con una solución patrón de ácido clorhídrico 0.01 N

Etilenglicol: libre de acidez

Fenolftaleína 0.1% en etanol

Procedimiento

Se recogieron alícuotas (muestra y blanco) sobre 0.2 ml de etilenglicol libre de acidez y se mantuvieron una hora en la oscuridad, para que se consuma el exceso de oxidante. Se tituló con una solución de hidróxido de sodio 0.01 N, utilizando la solución de fenolftaleína como indicador.

Cálculos

$$(m - b) \times 0.01 \times f_{\text{OHNa}} = a = \text{meq de ácido fórmico presente en la alícuota A}$$

$$a \times \frac{V}{A} \times 10^{-6} = \text{moles de ácido fórmico producido}$$

Donde m = ml de OHNa consumidos por la muestra

b = ml de OHNa consumidos por el blanco

DETERMINACION DE FORMALDEHIDO

Se aplicó el método espectrofotométrico descrito por Eeprive (1937) y adaptado por Lambert y Neish (1950)

Reactivo de ácido cromotrópico

Se preparó según la técnica descrita por Mac Fadyen (1945). Un gramo de ácido cromotrópico se disolvió en 100 ml de agua y se llevó a 500 ml en un matraz aforado por agregado de ácido sulfúrico 12.5 M. La solución se conserva inalterada dos o tres semanas en la oscuridad.

Curva de calibración

Se oxidaron 0.1 milimoles de manitol con 6 ml de periodato de sodio 0.1 M. A la mezcla de oxidación se le agregaron 2 ml de bicarbonato de sodio 1M y se dejó a 25° durante una hora para completar la oxidación. Se acidificó con 15 ml de ácido sulfúrico 1 N y se agregaron 5 ml de metaarsenito de sodio 1 M agitando suavemente hasta la desaparición total del iodo.

Se tomó 1 ml de esta solución y de soluciones diluidas al 1/2, 1/4, 1/5 y 1/10 y se hizo con ellas la reacción de color.

Procedimiento

Se tomó 1 ml de cada una de las soluciones testigo, muestra y blanco y se le agregó 10 ml de reactivo de ácido cromotrópico. Se calentaron los tubos durante 30 minutos en un baño de agua hirviendo. Las soluciones tomaron color púrpura. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm.

Con los datos obtenidos se construyó una curva patrón, que se utilizó para calcular la concentración de formaldehído (en micromoles por ml) presentes en la muestra.

CARACTERISTICAS DEL MATERIAL

Se utilizaron estromos maduros y secos de Cyttaria harti Fischer que parasitaban Nothofagus Antartica y fueron recogidos en San Martín de los Andes, Neuquén.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DEL ACIDO D-ARABINO HEXULOSONICO

Se maceró el polvo seco de hongo (10 g) con 400 ml de agua destilada a temperatura ambiente .Se separó el residuo insoluble por centrifugación y se separaron los polisacáridos por precipitación con etanol y posterior centrifugación. Se evaporó el sobrenadante a presión reducida en baño de agua a temperatura inferior a 40°. El residuo se extrajo con metanol que se separó del insoluble.

La cromatografía en papel de la fracción insoluble en metanol reveló la presencia de un compuesto con las mismas características cromatográficas que una muestra auténtica de D-arabino hexulosonato de Bario: R_f 0.23 (solvente 1); 0.41 (solvente 2) y 0.60 (solvente 4) revelado con los reactivos a y c. Con este último daba un color rosa característico.

La fracción que contenía el cetoácido se separó por cromatografía en papel.

IDENTIFICACION

Se redujo la fracción separada en papel (20 mg) con BH₄Na (150 mg/ 2ml de H₂ O) Se agitó durante una hora y se destruyó el exceso de borohidruro de sodio por agregado de ácido acético gota a gota. La solución se descationizó por agitación con resina Dowex 50 (H⁺). La solución se llevó a seco a presión reducida y se eliminó el ácido bórico destilándolo con metanol (5 veces). El residuo se tomó con ácido clorhídrico concentrado (0.5 ml) y se llevó a seco (100° con vacío para ayudar la lactonización) Se procedió de manera similar con una muestra de ácido D-arabino hexulosónico (20 mg).

La cromatografía en papel del producto así obtenido mostró dos manchas de R_f similar al de testigos, corridos en las mismas condiciones, de D-glucono-1,4-lactona y D-manono-1,4-lactona (solventes 1 y 3, reveladores a y e)

La fracción que contenía el cetoácido (descationizada y liofilizada) y el producto de su reducción y lactonización fueron analizados como trimetilsililéteres por cromatografía gas líquido. Las condiciones de operación fueron:

Columna i - T° inyección 250° - T° detector 300°

T° columna: 3' a 150° y luego programada entre 150 y 185° a razón de 10° / minuto

Columna ii - T° inyección 290° - T° detector 320°

T° columna programada entre 120 y 200° a razón de 4° / minuto

Los resultados (Tabla 11) aparecen en el capítulo de Resultados

DETERMINACION CUANTITATIVA

Se extrajeron 10 g de hongo seco con 500 ml de agua destilada, utilizando para ello un Waring blender al que se lo hizo funcionar tres veces con intervalos de 5 minutos entre cada una de ellas. Se precipitaron los polisacáridos por agregado de etanol hasta llegar a una concentración del 60% (en etanol). Se centrifugó, se eliminó el etanol a 30° a presión reducida y el extracto acuoso se liofilizó. El producto liofilizado se tomó con agua y se llevó a un volumen de 50 ml.

Para la determinación cuantitativa del ácido se adaptó el método de cromatografía en papel usado para determinar azúcares reductores con clorhidrato de p-anisidina. Se preparó una curva de calibración con una solución del ácido D-arabino hexulosónico obtenido por descationización y liofilización de su sal de Bario (0.2095 g/10 ml). Se sembraron alícuotas de esta solución y del extracto acuoso en papel Whatmann N°1. Se desarrolló en solvente 4 durante 18 horas. Los cromatogramas se secaron y se revelaron con solvente d. Se cortaron las manchas y se eluyeron con 4 ml de Cl_2Sn . Se midieron las absorbancias a 510 nm. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

Previamente se había hecho el espectro de absorción UV con ácido D-arabino hexulosónico obteniéndose un $\lambda_{\text{max}} = 510 \text{ nm}$.

Los resultados obtenidos se observan en la Tabla 28

TABLA 28

DETERMINACION CUANTITATIVA DEL ACIDO D-ARABINO HEXULOSONICO

Muestra	Alícuota	Absorbancia	g ácido
Testigo	2 μ l	0.14	41.90
Testigo	4 μ l	0.25	83.80
Testigo	6 μ l	0.38	125.70
Testigo	8 μ l	0.49	162.60
Testigo	10 μ l	0.68	209.50
Extracto acuoso	50 μ l	0.34	112 (112 mg en los 50 ml)
Extracto acuoso	75 μ l	0.45	152 (108 mg en los 50 ml)

Con estos datos se calcularon los datos de porcentaje de ácido presente en el polvo de hongo.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE LA α, α - D - TREHALOSA

Para continuar con trabajos previos realizados sobre la composición en azúcares simples de Cytteria barioti Fischer ,se tomó una fracción de una columna de celulosa obtenida a partir de un extracto metanólico de dicho hongo (A.Fernández Cirelli)

Dicha fracción (0.803 g) presentaba,por cromatografía en papel,una mancha de R_g similar a un standard de trehalosa: 0.5 (solvente 1);0.63 (solvente 2) y 0.75 (solv 3) revelado con reactivo a y R_f 0.87 (solvente 11) en placa de celulosa.La trehalosa no se revelaba con reactivo c por ser no reductora,pero sí la fracción en estudio.

Se trató esta fracción (5mg) con trehalosa fosforilasa extraida de Euglena Gracilis (Marchal y col,1970).Al cabo de 24 horas se observó un aumento notable del poder reductor y la aparición por cromatografía de una mancha de R_g=1 (solv 1 y 2).

Se recristalizó el jarabe de etanol y se obtuvo un precipitado cristalino (0.05g) de punto de fusión y punto de fusión mezcla con trehalosa comercial: 132-137°

punto fusión trehalosa comercial:135-137°

punto fusión de literatura;133-139° (Reisener y col,1962)

$$\left[\alpha \right]_{\text{D}}^{20} \text{ del precipitado obtenido} = + 180 \text{ (cl.O, H}_2\text{O)}$$

$$\left[\alpha \right]_{\text{D}}^{20} \text{ trehalosa} = + 184 \text{ (c 1.O; H}_2\text{O)}$$

Este oligosacárido se hidrolizó (9 mg) con ácido sulfúrico 1N (10 ml) calentando a reflujo durante 3 horas.Se trató el producto con carbonato de bario y se filtró a través de un lecho de celite.Se descationizó la solución con resina Dowex 50 (H⁺) y se llevó a seco a Presión reducida.El jarabe así obtenido dio por cromatografía en papel una única mancha de R_g=1 (solvente 3,revelador a y b).

El oligosacárido (10 mg) se trató con 1 ml de piridina:acetato de etilo (1:1) durante 10 minutos en un baño de agua a ebullición, se dejó unas horas a temperatura ambiente y luego se llevó a seco en un desecador con hidróxido de potasio y ácido sulfúrico, tratando el producto con metanol (5 veces). Se recristalizó el acetato de etanol:metanol (1:1) y se obtuvo un producto cristalino de

p.f: 95-95° pf mezcla :94-96°
p.f: octaacetato de trehalosa :97-99° (Hudson y col,1915)

El oligosacárido se sililó según la técnica general descripta y se hizo cromatografía gas líquido del Trimetisililéter obtenido

TABLA 26

CGL DEL OLIGOSACARIDO AISLADO DE CYTTARIA HARIOTI FISCHER

<u>Muestra (como TMS éter)</u>	<u>Tr</u>
Glucosa	4'
Trehalosa	11'
Oligosacárido	11'

Condiciones: columna ii - Temperatura de la columna programada entre 150 y 250° a razón de 10° / min

T° detector: 300° - T° inyector: 250° - Flujo de N₂ 30 ml / min

DETERMINACION CUANTITATIVA DE LA TREHALOSA

Un extracto acuoso de hongo seco (14 g extraidos con 500 ml de agua destilada en un Waring blender a temperatura ambiente) se liofilizó. El producto liofilizado se tomó con H₂O (50 ml) y se fermentó la solución 48 horas a 37° con Saccharomyces cerevisiae (Lederkremer y Ranalli,1967). El producto fermentado se trató con carbón

y se filtró a través de un lecho de celite. Se llevó la solución a un volumen de 50 ml. A esto lo llamamos extracto fermentado.

Una alícuota del extracto fermentado (4.8 ml) se sembró cuantitativamente en papel ^h Watmann N° 3 MM para separar la fracción con Rg= trehalosa que llamamos Fracción I y una vez aislada se la llevó a un volumen de 2.5 ml,

Se procedió a determinar la cantidad de trehalosa presente en la Fracción I y en el extracto fermentado. Para ello se incubaron cada uno de ellos con trehalasa en buffer fosfato de pH 7, según se indica en el Esquema 14. Paralelamente se trabajó con trehalosa 0.1M y se hicieron blancos sin enzima. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado. Previamente se había observado con trehalosa que el poder reductor permanecía constante después de 24 horas de incubación con la enzima a 37°, por lo que se procedió a utilizar las mismas condiciones.

ESQUEMA 14

HIDROLISIS CON TREHALASA EXTRAIDA DE RIÑÓN

	Trehalasa renal	Buffer fosfato	Trehalosa 0.1 M	extracto fermentado	fracción I
Tubo 1	10 μ l	10 μ l	-	-	-
Tubo 2	10 μ l	10 μ l	10 μ l	-	-
Tubo 3	10 μ l	10 μ l	-	-	-
Tubo 4	10 μ l	10 μ l	-	100 μ l	-
Tubo 5	10 μ l	10 μ l	-	-	-
Tubo 6	10 μ l	10 μ l	-	-	100 μ l

Se incubaron todos los tubos durante 24 horas a 37° sobre tolueno, se calentaron luego 5 minutos en un baño de agua a ebullición para inactivar la enzima y se agregaron a los tubos 1, 3 y 5; 10 μ l de trehalosa 0.1M ; 100 μ l del extracto fermentado y 100 μ l de fracción I, respectivamente

Se llevó el volumen de todos los tubos a 1 ml y se determinó la glucosa liberada por acción de la trehalasa con el reactivo de glucosa oxidasa-peroxidasa. La curva de calibración se construyó con glucosa 0.001M. Los resultados obtenidos se observan en la Tabla 27

TABLA 27

DETERMINACION DE LA GLUCOSA LIBERADA POR ACCION DE LA TREHALASA

Muestra	Alícuota	Absorbancia	Glucosa en la alícuota (nmoles)	Glucosa total (nmoles)
Glucosa 10^{-3} M	10 μ l	0.131	10	
Glucosa 10^{-3} M	20 μ l	0.321	20	
Glucosa 10^{-3} M	30 μ l	0.498	30	
Glucosa 10^{-3} M	40 μ l	0.627	40	
Glucosa 10^{-3} M	50 μ l	0.849	50	
Tubo 1	25 μ l	0.005	-	
Tubo 2	10 μ l	0.310	19	1.920
	25 μ l	0.795	49	1.960
Tubo 3	50 μ l	0.060	4	
Tubo 4	50 μ l	0.447	28	0.480
	75 μ l	0.686	42	0.500
Tubo 5	50 μ l	0.030	2	
Tubo 6	50 μ l	0.604	37	0.740

Nota: la numeración de los tubos corresponde a la del Esquema 14

ASELAMIENTO Y PURIFICACION DEL POLISACARIDO

Estromas molidos (260 g) secados en estufa de vacío hasta constancia de peso se extrajeron con éter de petróleo liviano (p eb. 60-80°) por un total de 30 horas y luego con metanol durante 50 horas en un aparato Soxhlet modificado.

El residuo (200 g; 75 % sobre estromas secos) se extrajo con 6 litros de agua a temperatura ambiente en dos partidas. La extracción se realizó en un Waring blender que se hizo funcionar intermitentemente tres veces durante 1 minuto con intervalos de 5 minutos. Se separó el extracto acuoso por centrifugación y filtración del sobrenadante al vacío a través de un lienzo y con un lecho de celite. El filtrado se concentró hasta un volumen final de 4 litros.

Se agregaron 2 litros de etanol 95% (concentración de etanol 32%) y apareció un precipitado gelatinoso que terminó de precipitar con una concentración de 40% de etanol. Se separó el polisacárido cuyas propiedades estructurales habían sido ya estudiadas (F. Cirelli y Lederkremer, 1971)

Entre 52% y 57% de etanol precipitó otro producto de consistencia pulverulenta. Se separó por centrifugación y se lavó sucesivamente con etanol 60% , 80% , 95% y finalmente con etanol absoluto. Por secado se obtuvieron 3.9 g de producto crudo (1.5% sobre estromas secos).

El producto así obtenido (3.8 g) se purificó por redisolución en 800 ml de agua destilada a temperatura ambiente, agitando con agitador mecánico Buchi durante 24 horas. Se trató con Carbón vegetal y se filtró a través de un lecho de celite. El volumen de la solución resultante fue de 960 ml. Se agregó etanol 95% gota a gota, apareciendo un precipitado cuando se llegó a una concentración del 41%. El polisacárido terminó de precipitar cuando se obtuvo una concentración de etanol del 46%. Se centrifugó y lavó sucesivamente con etanol 50% ; 95% y etanol absoluto. Por secado se obtuvieron 1.78 g de un polisacárido (polisacárido A; 47% sobre producto crudo).

Al llegar a una concentración de etanol del 63% precipitaba otro polisacárido 0.700 g (polisacárido C;18% sobre producto crudo) Se centrifugó y lavó con etanol 50% ; 95% y etanol absoluto y se guardó para futuras investigaciones.No se estudiaron los productos de mayor solubilidad.

El polisacárido A se purificó dos veces más siguiendo el mismo procedimiento, con lo que se obtuvo constancia de poder rotatorio.

Producto crudo	$\begin{array}{c} 20 \\ \alpha \\ D \end{array}$	$= + 157.0 \text{ (c 0.4 ; H}_2\text{O)}$
Producto obtenido 1º purificación	$\begin{array}{c} 20 \\ \alpha \\ D \end{array}$	$= + 171.0 \text{ (c 0.3 ; H}_2\text{O)}$
Producto obtenido 2º purificación	$\begin{array}{c} 20 \\ \alpha \\ D \end{array}$	$= + 172.0 \text{ (c 0.7 ; H}_2\text{O)}$
Producto obtenido 3º purificación	$\begin{array}{c} 20 \\ \alpha \\ D \end{array}$	$= + 172.0 \text{ (c 0.7 ; H}_2\text{O)}$

PROPIEDADES DEL POLISACARIDO

El polisacárido secado a 60°/0.1 mm durante 6 horas sobre pentóxido de fósforo dio un poder rotatorio
$$\begin{array}{c} 20 \\ |\alpha| \\ D \end{array} = + 172 \text{ (c 0.7 ; H}_2\text{O)}.$$

El contenido en Nitrógeno resultó menor que 0.8% y no se encontraron cenizas.Los análisis de metoxilo y acetilo dieron negativos.El polisacárido dio una muy leve coloración violácea por agregado de una solución de iodo/ioduro de potasio.

DETERMINACIONES FISICAS

ULTRACENTRIFUGACION

Se usó una solución 0.5% del polisacárido en ClNa 0.1 M. Las placas de sedimentación se obtuvieron con una ultracentrífuga Spinco Modelo E , a 20° y a una velocidad de corrida de 52640 r.p.m. El polisacárido dio un único pico (Figura 13) El $S_{20,w}$ fue 3.1×10^{-43} S

DETERMINACION DE HOMOGENEIDAD POR PRECIPITACION FRACCIONADA CON ETANOL

Se realizó según la técnica descripta por Whistler y Be Miller (1956).

0.400 g del polisacárido purificado se disolvieron con agitación en 200 ml de agua (concentración 0.2%). Se agregó etanol gota a gota agitando hasta turbidez incipiente (110 ml de etanol ; concentración de etanol 35%). El etanol utilizado en todos los casos fue 95%. Se agregaron 40 ml más de etanol (concentración de etanol 40%) y se dejó decantar durante una noche. El precipitado se centrifugó, se lavó varias veces con etanol, se secó en desecador, luego sobre pentóxido de fósforo a 65°/1 mm durante dos horas y se pesó. Al sobrenadante se le agregó etanol gota a gota hasta observar nueva precipitación (44% de etanol). Se aisló la fracción insoluble de manera similar a la descripta. Se continuó con el mismo porcedimiento hasta llegar a una concentración de etanol del 56%.

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 29. Con ellos se construyó la curva de precipitación correspondiente (Figura 12)

TABLA 29

Concentración de etanol (% v/v)	% polisacárido precipitado
0 - 35	-
35 - 40	2
40 - 44	95
44 - 48	2
48 - 52	1
52 - 56	-

HIDROLISIS TOTAL DEL POLISACARIDO

Hidrólisis ácida

El polisacárido (60 mg) se hidrolizó por calentamiento con ácido sulfúrico 1 N (10 ml) en un tubo cerrado durante 18 horas a 110°. El hidrolizado se enfrió, se neutralizó con carbonato de bario y se filtró a través de un lecho de celite. El filtrado se descationizó por agitación con resina Dowex 50 (H^+) y se concentró a presión reducida con lo que se obtuvo un jarabe (50 mg). Por cromatografía en papel (solventes 1,2 y 3) se observaba solamente glucosa, la cual se identificó por preparación de la N-(p-nitrofenil)-D-glucosil-piranosilamina, según la técnica descrita por Weygand y col (1951). El hidrolizado, llevado a seco, se tomó con 4 ml de metanol, se agregaron 60 mg de p-nitroanilina y se calentó en baño de agua. A los 15 minutos se disolvió totalmente y se continuó el calentamiento hasta obtener un producto cristalino en forma de agujas amarillo claras. Se enfrió, se filtró y lavó con éter. Se recristalizó de metanol y se obtuvo N-(p-nitrofenil) D-glucopiranosilamina de pf y pf mezcla 183-184° (Según Weygand y col pf 184°)

El hidrolizado reducido y sililado dio por cromatografía gas líquido en la columna ii un único pico idéntico al de una muestra de sorbitol sililado.

Hidrólisis enzimática

Se incubaron a 37° sobre tolueno el polisacárido (6.74 mg) con 0.2 mg de α -amiloglucosidasa (50 U/mg) disueltos en 5 ml de buffer acetato de sodio/ácido acético 0.1M (pH 4.8). Se extrajeron alícuotas a las 2 y a las 24 horas sobre las cuales se determinó el contenido en glucosa con el reactivo de glucosa oxidasa-peroxidasa según la técnica general descripta.

Simultáneamente se incubaron en las mismas condiciones un blanco sin enzima y un testigo con amilosa (5.15 mg). Se utilizó como patrón una solución de glucosa 10^{-3} M. Los resultados se pueden ver en la Tabla 30

HIDROLISIS ACIDA PARCIAL

El polisacárido (63 mg) se calentó en un baño de agua a reflujo con 15 ml de ácido sulfúrico 1N durante 3 horas. El hidrolizado se neutralizó con carbonato de bario, se filtró y evaporó a presión reducida. Se obtuvo un jarabe (60 mg) que por cromatografía en papel dio dos manchas importantes, una de glucosa y la otra de $R_f = 0.49$ (solvente 1) y $R_f = 0.48$ (solvente 2) idéntico al de una muestra de isomaltosa corrida en las mismas condiciones y reveladas con reactivos a y b.

Se veían también en menor proporción un componente de $R_f = 0.7$ (solvente 1) y $R_f = 0.6$ (solvente 2) valores coincidentes con los de un standard de maltosa; así como oligosacáridos mayores de $R_f = 0.33; 0.22$ y 0.1 (solvente 1).

Para establecer la relación entre la movilidad y el grado de polimerización de los oligosacáridos (French, 1953) se desarrollaron cromatogramas hasta el frente (solvente 1) obteniéndose los valores que figuran en la Tabla 31

TABLA 31

RELACION ENTRE LA MOVILIDAD Y EL GRADO DE POLIMERIZACION DE LOS OLIGOSACARIDOS
OBTENIDOS POR HIDROLISIS ACIDA PARCIAL

Sustancia	R_f	$R_f / 1 - R_f$
Glucosa	0.36	0.56
Maltosa	0.24	0.32
Isomaltosa	0.19	0.23
Hidrolizado parcial	0.36	0.56
	0.26	0.35
	0.19	0.23
	0.17	0.19
	0.15	0.13;
	0.09	0.09
	0.06	0.063

Cromatografía gas líquido del hidrolizado parcial

La mezcla de oligosacáridos (10 mg) se redujo por tratamiento con una solución 2% de borohidruro de sodio. Se agitó durante una hora a temperatura ambiente. Se destruyó el exceso de borohidruro de sodio por agregado de ácido acético gota a gota y luego se agitó con resina Dowex 50 (H^+), se filtró y evaporó a presión reducida. Se eliminó el bórico tratando el residuo con metanol (5 veces x 3 ml) y evaporando el borato de metilo así formado a 35° y presión reducida. El producto así reducido no se reveló con reactivos b y c y sí con reactivo a, lo cual indicó que la reducción fue total.

De manera similar se prepararon muestras de maltitol, isomaltitol y sorbitol a partir de maltosa, isomaltosa y glucosa, respectivamente.

Los polialcoholes obtenidos se sililaron según la técnica general descrita y se analizaron por cromatografía gas líquido. Los resultados aparecen en la Tabla 14 y las condiciones que se utilizaron fueron:

Columna ii - T° columna programada entre 150 y 250° a razón de 15°/minuto

T° detector: 250° T° inyección 300° - Flujo N_2 30 ml/min

El polisacárido hidrolizado se separó por cromatografía en papel Watmann 3MM (solvente 1) en tres fracciones

Fracción 1 (15 mg) por cromatografía en papel (solventes 1 y 2) se observó una única mancha de $R_g = 1$

Fracción 2 (15 mg) por cromatografía en papel (solventes 1 y 2) se veía un componente principal cuyo R_g coincidía con el de una muestra de isomaltosa, otra mancha menor de R_g similar al de la maltosa y oligosacáridos mayores.

Esta fracción (2 mg) se la sometió a una separación analítica por cromatografía en Sephadex G-10.

Se recogieron alícuotas primero de 1 ml, luego de 0.5 ml y por último de 0.3ml y se midió la cantidad de azúcar reductor en cada tubo por el método de fenol-sulfúrico. Se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 32)

Por cromatografía en papel se observó lo siguiente:

Tubo 18 (10.6 ml) una mancha de $R_f = 0.45$ (solvente 1) y $R_f = 0.30$ (solvente 2) coincidente con los R_f encontrados para maltotriosa (ver más adelante).

Tubo 21 (11.5 ml) y 23 (12.1 ml) dos manchas, una de $R_f = 0.50$ (solv 1) que coincidía con el de una muestra de isomaltosa y otra de $R_f = 0.18$ (solv 1) no identificada.

Tubo 25 (12.7 ml) una mancha de $R_f = 1$ (solvente 1).

Calibración de la columna

Para conocer el Volumen de exclusión (V^0) se cromatografió en la misma columna de Sephadex el polisacárido (2 mg) y se construyó la curva correspondiente. Se obtuvo un $V^0 = 6.5$ ml.

Además se calibró la columna con maltosa (3.4 mg) y glucosa (3.6 mg). Los resultados pueden observarse en las Tablas 33 y 34; con ellos se construyeron las curvas correspondientes.

Fracción 3 (10 mg) por cromatografía en papel se detectó isomaltosa y oligosacáridos mayores. Se la analizó también (3 mg) por cromatografía en columna de Sephadex G-10, obteniéndose los siguientes resultados (Tabla 35).

Por cromatografía en papel de las subfracciones obtenidas se observó lo siguiente:

Tubo 25 (12.5 ml) y 26 (12.8 ml) una única mancha de $R_f = 0.50$ (solvente 1) de las mismas características a la de una muestra de isomaltosa

Tubo 21 (11.3 ml) aparecían manchas de $R_f = 0.43; 0.31; 0.22$ y 0.11 (solvente 1)

Tubos 16, 17 y 18 (9.6 ml a 10.2 ml) daban una única mancha de $R_f = 0.22$

Tubo 15 (9.3 ml) dos manchas de $R_f = 0.22$ y 0.11 (solvente 1)

TABLA 32CROMATOGRAFIA EN SEPHADEX G-10 DE LA FRACCION 2 DEL HIDROLIZADO PARCIAL

Tubo N°	ml	Absorbancia	Tubo N°	ml	Absorbancia
6	6.0	-	20	11.2	0.160
7	6.5	0.085	21	11.5	0.225
8	7.0	0.110	22	11.8	0.125
9	7.5	-	23	12.1	1.250
10	8.0	-	24	12.4	0.210
11	8.5	0.06	25	12.7	0.185
12	8.8	-	26	13.0	0.095
13	9.1	-	27	13.3	0.065
14	9.4	-	28	14.3	-
15	9.7	0.005	29	14.6	-
16	10.0	0.007	30	14.9	-
17	10.3	0.010	31	15.4	0.050
18	10.6	0.080	32	15.8	-
19	10.9	0.070	33	16.4	-

TABLA 33CROMATOGRAFIA EN SEPHADEX G-10 DE GLUCOSA

Tubo N°	ml	Absorbancia	Tubo N°	ml	Absorbancia
5	5.0	-	25	15.5	4.000
10	8.0	0.020	26	16.0	2.400
15	10.5	-	27	17.5	0.92
20	13.0	0.050	28	18.0	0.78
22	14.0	0.100	29	18.5	0.40
23	14.5	0.500	30	19.0	0.055
24	15.0	3.300	31	19.5	-

TABLA 34CRÓMATOGRAFÍA EN SEPHADEX G-10 DE MALTOSA

Tubo N°	ml	Absorbancia	Tubo N°	ml	Absorbancia
5	5.0	-	17	12.5	0.630
7	7.0	-	18	13.0	1.600
11	9.5	0.115	19	13.5	2.100
12	10.0	0.330	20	14.0	1.600
13	10.5	0.265	21	14.5	0.880
14	11.0	0.080	22	15.0	0.325
15	11.5	0.220	24	16.0	0.150
16	12.0	0.220	25	16.5	-

TABLA 35CRÓMATOGRAFÍA EN SEPHADEX G-10 DE LA FRACCIÓN 3 DEL HIDROLIZADO PARCIAL

Tubo N°	ml	Absorbancia	Tubo N°	ml	Absorbancia
6	6.0	0.160	18	10.2	0.195
7	6.5	0.092	19	10.5	0.175
8	7.0	-	20	10.8	0.175
9	7.3	0.020	21	11.3	0.190
10	7.6	-	22	11.6	0.170
11	7.9	0.020	23	11.9	0.125
12	8.4	0.040	24	12.2	0.150
13	8.7	-	25	12.5	0.380
14	9.0	0.055	26	12.8	1.150
15	9.3	0.140	27	13.1	0.050
16	9.6	0.125	28	13.6	-
17	9.9	0.165	29	14.1	-

Para establecer la relación entre la movilidad y el grado de polimerización de estos oligosacáridos se corrieron cromatogramas (solventes 1 y 2) con xilosa como referencia (Tabla 36)

Tabla 36

RELACION ENTRE LA MOVILIDAD Y EL GRADO DE POLIMERIZACION

Sustancia	Solvente 1		Solvente 2	
	R_{xilosa}	$(R_{xil}/1-R_{xil})$	R_{xilosa}	$(R_{xil}/1-R_{xil})$
glucosa	0.77	3.34	0.78	3.5
maltosa	0.54	1.17	0.50	1.00
isomaltosa	0.42	0.72	0.41	0.70
laminaribiosa	0.66	1.90	-	-
Tubos 25 y 26	0.42	0.72	0.42	0.72
Tubo 21	0.42	0.72	0.41	0.69
	0.29	0.40	0.27	0.37
	0.20	0.25	0.20	0.25
Tubos 16 → 18	0.20	0.25	0.20	0.25
Tubo 15	0.20	0.25	0.20	0.25
	0.12	0.13	0.12	0.13

ESTUDIOS DE ACETOLISIS

Se aplicó la técnica descrita por Matsuda y col (1961) para la acetólisis de un dextrano, que está basada en la empleada por Hess y Dziengel (193_) para celulosa.

Se agregaron 400 mg del polisacárido a una mezcla previamente enfriada en baño de hielo de 5.5 ml de anhídrido acético ; 4 ml de ácido acético glacial y 0.7 ml de ácido sulfúrico concentrado. Se dejó durante siete días a temperatura ambiente, al cabo de los cuales se calentó una hora a 60°. Se filtró y el filtrado se volcó sobre 200 ml de hielo y se trató con solución saturada de bicarbonato de sodio. El acetolizado se extrajo con cloruro de metileno (5 veces x 50ml) y luego se lavó con agua. Se secó con sulfato de sodio anhidro y se eliminó el solvente a presión reducida. Se obtuvieron, después de secar a 40°/1 mm durante dos horas, 350 mg de un jarabe de poder rotatorio

$$\left[\alpha \right]_D^{20} = + 73 \quad (c \ 1.0 ; Cl_2CH_2)$$

El acetolizado se disolvió en metanol y se trató con 10 ml de metóxido de sodio 0.1 N (preparado a partir de 35 mg de sodio en 15 ml de metanol). Se dejó a temperatura ambiente durante una noche, se agregó agua para disolver el precipitado formado y se descationizó por agitación con resina Dowex 50 (H⁺). La solución se evaporó a presión reducida, obteniéndose 300 mg de producto desacetilado. Por cromatografía en papel de este producto se observaba solamente glucosa y maltosa en grandes cantidades y en menor proporción una mancha de R_g = 0.45 (solvente 1) y R_g = 0.32 (solvente 2) reveladas con reactivos a y c, coincidente con el valor encontrado para la maltotriosa. No se reveló ninguna mancha de R_g=nigerosa.

Se separó la glucosa de los oligosacáridos por cromatografía en papel. La fracción que contenía los oligosacáridos se pasó a través de una columna de Sephadex G-10 midiendo en cada tubo la cantidad de azúcar reductor por el método de fenol-sulfúrico. Con los resultados obtenidos (Tabla 37) se construyó la curva de elución correspondiente.

TABLA 27

CRONOMETRÍA EN CROMATÓGRAFO DE LOS OLIGOSACÁRIDOS PROVENIENTES DE ACETOLISIS

Tubo N°	ml	Absorbancia	Tubo N°	ml	Absorbancia
6	6.0	0.18	19	9.9	0.045
7	6.3	-	20	10.2	0.115
8	6.6	0.025	21	11.2	0.285
9	6.9	0.025	22	11.5	0.400
10	7.2	0.035	23	11.8	0.510
11	7.5	0.0025	24	12.1	0.660
12	7.8	0.009	25	13.1	0.350
13	8.1	-	26	13.4	0.125
14	8.4	0.030	27	13.7	0.035
15	8.7	0.100	28	14.0	0.015
16	9.0	0.090	29	14.3	0.040
17	9.3	0.075	30	14.6	0.100
18	9.6	0.050	31	14.9	0.015

Por cromatografía en papel se observaba:

Tubos 13 \rightarrow 19 (8 \rightarrow 10 ml) un único producto de $R_f = 0.45$ (solvente 1) y 0,30 (solvente 2) coincidentes con los valores encontrados para la maltotriosa

Tubos 23 \rightarrow 25 (11.8 \rightarrow 13.1 ml) una única mancha de maltosa (solvente 1 y 2)

ESTUDIOS ENZIMATICOSHIPOGLICEMIA CON ALFA AMILASA BACTERIANA

Se incubó el polisacárido (6.6 mg) con 10 mg de alfa amilasa bacteriana (170 Unidades/mg) en 2 ml de buffer glicerofosfato de sodio 15 mM (pH 5.7). Paralelamente se hidrolizó en las mismas condiciones glucógeno (8.0 mg). Las incubaciones se realizaron a 37° sobre tolueno. Se midió el poder reductor de cada uno de los tubos sobre alícuotas extraídas a distintos intervalos de tiempo, según el método de Somogy Nelson. Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla 38. Como standard se utilizó una solución de maltosa de 3.38 mg/ml.

TABLA 38HIPOGLICEMIA ENZIMATICA CON ALFA AMILASA

Muestra	Alícuota	24 horas		48 horas		72 horas	
		Absorbancia	μ g	Absorbancia	μ g	Absorb.	μ g
Maltosa (3.38 mg/ml)	20 μ l	0.14	67.6	0.14	67.6	0.12	67.6
	30 μ l	0.28	101.4	0.28	101.4	0.22	101.4
	40 μ l	0.34	135.2	0.34	135.2	0.29	135.2
	50 μ l	0.57	169.0	0.57	169.0	0.43	169.0
	70 μ l	0.80	236.6	0.80	236.6	0.78	236.6
Polisacárido hidrol. con alfa amilasa	200 μ l	0.09	59.0	0.04	46.0	0.04	46.0
Glucógeno hidrol. con alfa amilasa	200 μ l	0.57	174.0	0.59	206.0	0.55	210.0

De los cálculos resulta que el polisacárido se hidroliza un 8% con alfa amilasa.

HIDROLISIS CON PULULANASA BACTERIANA

El polisacárido (5.2 mg) se hidrolizó con 0.6 mg de pululanasa bacteriana (0.8 Unidades/mg) en presencia de 1 mg de albúmina sérica humana en 2.5 ml de buffer citrato de sodio-ácido cítrico $10^{-2}M$ (pH 5). Se incubó a 37° sobre tolueno y se extrajeron alícuotas a distintos intervalos de tiempo para medir poder reductor según el método de Somogy Nelson. Se usó como standard una solución de glucosa 0.8 mg/ml. Paralelamente se incubó un tubo sin enzima (Blanco polisacárido) y otro al que no se le agregó polisacárido (Blanco enzima). También se hidrolizaron 6.4 mg de glucógeno. Los resultados se observan en la Tabla 39

TABLA 39HIDROLISIS CON PULULANASA BACTERIANA

Muestra	Alícuota	Absorbancia				
		4 hs	8 hs	24 hs	30hs	48 hs
Glucosa (0.8 mg/ml)	20 μ l	0.125	0.120	0.145	0.145	0.120
	40 μ l	0.375	0.240	0.287	0.287	0.230
	80 μ l	0.520	0.500	0.570	0.570	0.490
	100 μ l	0.690	0.600	0.680	0.680	0.600
	150 μ l	0.900	0.980	0.910	0.910	0.900
Polisacárido hidrol. con pululanasa	100 μ l	0.540	0.630	0.660	0.710	0.620
	100 μ l	0.580	0.670	0.690	0.690	0.620
Glucógeno hidrol. con pululanasa	100 μ l	0.065	0.070	0.080	0.070	0.065
Blanco polisacárido	100 μ l	0.070	0.070	0.070	0.070	0.070
Blanco enzimático	100 μ l	-	-	-	-	-

Con estos valores se calculó el porcentaje de hidrólisis del polisacárido (expresado como glucosa)

TABLA 40

PORCENTAJE DE HIDRÓLISIS DEL POLISACÁRIDO CON PULULANASA

Tiempo	mg glucosa/ 0.1 ml	mg glucosa/ 2.5 ml	% hidrólisis
4 horas	7.3×10^{-2}	1.72	30
	7.8×10^{-2}	1.85	32
8 horas	7.4×10^{-2}	1.82	31
	7.9×10^{-2}	1.86	33
24 horas	7.4×10^{-2}	1.82	31
	7.4×10^{-2}	1.82	31
30 horas	7.6×10^{-2}	1.90	32
	7.4×10^{-2}	1.82	31
48 horas	8.15×10^{-2}	2.03	35
	8.15×10^{-2}	2.03	35

Por cromatografía en papel de alícuotas extraídas del hidrolizado a las 4 horas, 8 horas y 24 horas de incubación se observó una única mancha de $R_f = 0.45$ (solvente 1) y $R_f = 0.32$ (solvente 2) reveladas con reactivos a y c; mientras que en las muestras correspondientes a 30 y 48 horas de incubación se revelaron, además de dicha mancha, cantidades crecientes de glucosa y maltosa (aunque siempre en menor proporción que la mancha anterior).

La cromatografía en papel de alícuotas extraídas de la incubación del glucógeno con pululanasa, no reveló la presencia de ningún oligosacárido de movilidad apreciable.

Para establecer la relación entre la movilidad y el grado de polimerización del oligosacárido obtenido por hidrólisis enzimática, se corrió una cromatografía en papel (solvente 1)

TABLA 41RELACION ENTRE MOVILIDAD Y GRADO DE POLIMERIZACION

Sustancia	R _F	$\alpha' = R_F / 1 - R_F$
Glucosa	0.35	0.54
Maltosa	0.23	0.30
Oligosacárido	0.15	0.17

El oligosacárido aparecía en el punto de la curva correspondiente a un trisacárido con uniones alfa-D- (1→4) (maltotriosa).

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DEL OLIGOSACARIDO PRODUCIDO EN LA HIDROLISIS CON PULULANASA

Se hidrolizó el polisacárido (400 mg) con pululanasa (2 mg) en 200 ml de buffer citrato 10^{-2} M (pH 5).Para disminuir la actividad de alguna alfa glucosidasa contaminante se efectuó la hidrólisis dentro de una bolsa de diálisis y se detuvo luego de 8 horas de incubación a 37°.Se estudiaron por separado las dos soluciones que quedaron.

Fracción A: solución exterior a la bolsa de diálisis

Fracción B: solución interior a la bolsa de diálisis

Ambas fracciones se calentaron durante 5 minutos en un baño de agua a ebullición para desactivar la enzima y luego se colocó durante otros 5 minutos a 0°C. Se filtraron las soluciones y se agitaron con resina Dowex 50(H⁺) primero y luego con Amberlite IR 45 (OH⁻).Después de cada tratamineto con resina se filtró la solución resultante y por último se llevó a seco a presión reducida.

Peso fracción A: 22 mg

Peso fracción B: 308.5 mg

$$\left[\alpha \right]_{\text{D}}^{20} = + 110 \quad (\text{fracción A})$$

El bajo poder rotatorio y el alto peso obtenido en total hizo pensar que no se habían eliminado totalmente las sales. Se repitió entonces el procedimiento de desalinificación, agitando directamente con una mezcla de Dowex 50 (H^+) y Amberlite IR 45 (OH^-) durante 1 hora. Se filtró y evaporó a presión reducida, con lo que se obtuvo:

Peso fracción A: 154 mg

Peso fracción B: 227 mg

La fracción A era cromatográficamente pura

La fracción B presentaba por cromatografía en papel (solvente 1) además de la mancha que presentaba la fracción A, otras de R_f menor.

Se secó la fracción A a $40^\circ/1$ mm durante dos horas y se tomó el poder rotatorio

$$\left[\alpha \right]_{\text{D}}^{20} = + 159 \quad (c \ 1.5 ; \text{H}_2\text{O})$$

Los valores de literatura para la maltotriosa son

$$\left[\alpha \right]_{\text{D}}^{20} = + 160 \quad (c \ 2.0 ; \text{H}_2\text{O}) \quad \text{Whelan y Bailey (1953)}$$

$$\left[\alpha \right]_{\text{D}}^{20} = + 157 \quad (c \ 1.0 ; \text{H}_2\text{O}) \quad \text{Pazur (1955)}$$

La fracción A se acetiló (50 mg) tratándola con 50 mg de acetato de sodio anhidro y 2 ml de anhídrido acético anhidro. Se calentó la mezcla en un baño de glicerina a 120° durante diez minutos y luego se mantuvo una hora a 100°C. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se volcó sobre hielo machacado. Se dejó reposar una noche. Se separó un aceite, se extrajo con Cl_2CH_2 (4 veces x 20 ml). se secó el extracto con sulfato de sodio anhidro y se llevó a seco a presión reducida. El jarabe obtenido se extrajo con etanol 95% caliente y el residuo se llevó a seco en un desecador sobre OHK y ácido sulfúrico. Se repitió el procedimiento varias veces, hasta que se obtuvo un precipitado cristalino que se recrystalizó de etanol 95%. El producto así obtenido (15 mg) era cromatográficamente puro : $R_f = 0.42$ (solvente 7) en placa delgada de sílica gel.

$$\left| \alpha \right|_D^{20} = + 92 \quad (c 1.0 ; \text{Cl}_2\text{CH}_2) \quad \text{y punto de fusión: } 134-137^\circ$$

Whelan (1953) informa para el hendecaacetato de maltotriosa

$$\left| \alpha \right|_D^{20} = + 86 \quad (c 1.0 ; \text{Cl}_2\text{CH}_2) \quad \text{punto de fusión : } 134-136^\circ$$

Se hizo un espectro de resonancia magnética nuclear de la fracción A (20 mg) en D_2O , encontrándose los valores esperados para el H glicosídico en uniones 1→4 : absorción a $\delta = 5.35$ (Usui y col, 1974).

La cromatografía en Sephadex G-10 de la fracción A, arrojó los siguientes resultados (Tabla 42). La concentración de azúcar reductor se midió según el método de fenol sulfúrico.

TABLA 42

DESORCIÓN EN SILICA G-10 DE LA FRACCIÓN A (MALTOTRIOSA)

Tubo N°	ml	Absorbancia	Tubo N°	ml	Absorbancia
1	1.0	-	15	10.5	0.56
5	5.0	-	16	11.0	0.33
8	7.0	-	17	11.5	0.15
9	7.5	0.15	18	12.0	-
10	8.0	0.32	19	12.5	-
11	8.5	0.95	20	13.0	-
12	9.0	2.15	21	13.5	0.10
13	9.5	2.70	22	14.0	0.07
14	10.0	1.56	23	14.5	-

La fracción B (100 mg) se separó por cromatografía en papel (solvente 2,90 horas) en 5 fracciones. Se numeraron en orden decreciente de Rf

Las fracciones 1,2 y 3 (60 mg) consistían en maltotriosa y trazas de maltosa.

La fracción 4 (6.5 mg) era cromatográficamente pura. Presentaba un Rf de 0.13 (solvente 1). Su poder rotatorio era + 170 (c 1.0 ; H₂O).

Se determinó el grado de polimerización de este oligosacárido según la técnica de Unrau y Smith. Se disolvieron 3.1 mg en 5 ml de agua, se agregaron 10 mg de BH₄Na y se agitó durante 20 horas. Se destruyó el exceso de borohidruro de sodio por agregado de ácido acético gota a gota y se ajustó el pH a 7.5 con CO₃HNa (solución saturada). Se agregaron 25 mg de metaperiodato de sodio y se dejó durante 4 días a temperatura ambiente en ausencia de luz. Se destruyó el exceso de oxidante con ácido

sulfúrico 1 N (7,5 ml) y arsenito de sodio 1 M (2,5 ml).La mezcla (21 ml) se dializó contra igual volumen de agua destilada durante 24 horas.Sobre 1 ml del dializado se determinó formaldehído según la técnica general descripta. Los resultados pueden observarse en la Tabla 43.

Tabla 43

DETERMINACION DEL GRADO DE POLIMERIZACION DE UN OLIGOSACARIDO PRODUCIDO POR
HIDROLISIS CON PULULANASA

Muestra	Absorbancia	Formaldehído (μ moles/ml)
Testigo I	0.85	0.5
Testigo II	0.46	0.25
Testigo III	0.31	0.15
Testigo IV	0.215	0.10
Testigo V	0.135	0.05
Oligosacárido (1 ml)	0.30	0.15

O sea que en 42 ml había 6.3 micromoles que provenían de 3.1 mg de lo que resulta que el Peso Molecular del oligosacárido es 492 si la unión terminal es a través del Oxígeno del C-6 ó 984 si es a través del Oxígeno del C-4

El oligosacárido (1mg) se hidrolizó durante 24 horas a 37° con una suspensión de pululanasa (18 mg/ 5 ml,0.5 ml) en 1 ml de buffer citrato.Se observó por cromatografía (solv 1) una mancha de R_g =maltotriosa ,habiendo desaparecido la de R_g = 0.13 . El tratamiento con alfa amilasa (1 mg) daba por cromatografía en papel (solv 1) glucosa y maltotriosa (en menor proporción),pero permanecía la de R_g = 0.13 como la más importante.

La fracción 5 consistía en una mezcla de oligosacáridos de muy poca movilidad por cromatografía en papel y que desaparecían totalmente por tratamiento con pululanasa para dar lugar a una única mancha de R_g = maltotriosa.

OXIDACION CON PERIODATO DE SODIO

En un matraz aforado de 100 ml se colocaron 122.9 mg de polisacárido con 50 ml de metaperiodato de sodio 0.1 M y se llevó a volumen con agua destilada. La oxidación se llevó a cabo a temperatura ambiente en ausencia de luz con agitación ocasional. Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos para medir el consumo de oxidante, la producción de ácido fórmico y la glucosa remanente. Paralelamente se realizó un blanco libre de azúcar.

DOSAJE DE PERIODATO DE SODIO

Se tomaron alícuotas de 0.2 ml que se agregaron a una solución de 5 ml de arsenito de sodio 0.01M ; 0.5 ml de solución saturada de CO_3HNa y 0.2 ml de IK 20%. Se procedió de acuerdo al método general descrito. Las determinaciones se efectuaron por duplicado. El factor del I_2 era 0.840. El consumo de periodato se expresó como moles de periodato/mol de glucosa anhidra. Los resultados se observan en la Tabla 44

DOSAJE DE ACIDO FORMICO

Se tomaron alícuotas de 1 ml que se agregaron a 0.2 ml de etilenglicol. Las determinaciones se realizaron de acuerdo a la técnica general descrita, y se realizaron todas por duplicado. El factor del OHNa era 1.1. Los resultados obtenidos se expresaron como moles de ácido fórmico/mol de glucosa anhidra y se observan en la Tabla 45

DOSAJE DE GLUCOSA REMANENTE

Se tomaron alícuotas de 1 ml que se redujeron e hidrolizaron de manera similar a la descrita a continuación para el oxopolisacárido. Se llevó a volumen (1 ml) sobre el cual se determinó el contenido en glucosa con el reactivo de

TABLA 44

DETERMINACION DEL CONSUMO DE IO_4^-

Tiempo	Muestra	I_2 consumido (ml)	IO_4^- consumido (moles $\times 10^{-5}$)	moles de IO_4^- / mgG
1 hora	Blanco	3.31		
	Polisacárido	3.45	37.5	0.49
3 horas	Blanco	3.51		
	Polisacárido	3.65	37.5	0.49
5 horas	Blanco	3.50		
	Polisacárido	3.65	40.0	0.53
1 día	Blanco	3.39		
	Polisacárido	3.69	67.4	0.88
3 días	Blanco	3.51		
	Polisacárido	4.00	80.0	1.05
4 días	Blanco	3.68		
	Polisacárido	4.10	85.0	1.12
5 días	Blanco	3.65		
	Polisacárido	4.10	97.5	1.28;
6 días	Blanco	3.87		
	Polisacárido	4.32	92.5	1.22
8 días	Blanco	4.00		
	Polisacárido	4.42	97.5	1.28
10 días	Blanco	4.38		
	Polisacárido	4.9	100.0	1.32

TABLA 45DETERMINACION DEL ACIDO FORMICO PRODUCIDO

Tiempo	Muestra	HONa consumido (ml)	meq HCOOH	mmoles HCOOH/mCa
1 hora	Blanco	0.02		
	Polisacárido	0.10	0.08	0.11
3 horas	Blanco	0.02		
	Polisacárido	0.11	0.099	0.13
5 horas	Blanco	0.04		
	Polisacárido	0.14	0.11	0.14
1 día	Blanco	0.02		
	Polisacárido	0.22	0.22	0.28
3 días	Blanco	0.02		
	Polisacárido	0.26	0.24	0.31
4 días	Blanco	0.02		
	Polisacárido	0.28	0.26	0.34
5 días	Blanco	0.02		
	Polisacárido	0.28	0.26	0.34
6 días	Blanco	0.02		
	Polisacárido	0.28	0.26	0.34
8 días	Blanco	0.02		
	Polisacárido	0.30	0.28	0.39
10 días	Blanco	0.02		
	Polisacárido	0.30	0.28	0.39

glucosa oxidasa- peroxidasa. Los resultados pueden observarse en la Tabla 46 y se expresaron como moles de glucosa remanente/mol de glucosa anhidra.

REDUCCION DEL POLIALDEHIDO

Al cabo de 10 días se destruyó el exceso de IO_4Na por agregado de etilenglicol (2 ml) y se dializó contra agua corriente durante 4 días y finalmente contra agua destilada.

Se agregaron 100 mg de borohidruro de sodio y a las 24 horas se hizo un nuevo agregado de 100 mg. Después de 24 horas se destruyó el exceso de BH_4Na en la mezcla por agregado de ácido acético gota a gota hasta pH 5. La solución se desionizó por diálisis contra agua destilada y se liofilizó.

HIDROLISIS ACIDA COMPLETA DEL POLIALCOHOL

El polialcohol liofilizado (10 mg) se hidrolizó con ácido sulfúrico 1N calentando a reflujo durante 15 horas. Se neutralizó el hidrolizado con hidróxido de bario-carbonato de bario y se descationizó por agitación con resina Dowex 50 (H^+). El filtrado se llevó a seco y se enrasó su volumen con agua en un matraz aforado de 3.08 ml.

Por cromatografía en papel se observaron manchas de movilidad igual a glucosa (reveladas con reactivos a y c); eritritol $R_f = 1.40$ (solvente 1); 1.54 (solvente 2); 1.2 (solvente 3) y 1.26 (solvente 4) revelado con reactivo a y glicerol $R_f = 1.65$ (solvente 1); 1.92 (solv 2); 1.32 (solv 3) y 1.39 (solvente 4).

DETERMINACION DE LA RELACION GLUCOSA-ERITRITOL-GLICEROL EN EL HIDROLIZADO TOTAL DEL POLIALCOHOL

1 ml del hidrolizado total del polialcohol, se llevó a seco y se preparó el Trimetilsililderivado. Simultáneamente se prepararon los TMS éteres de glucosa, glicerol y eritritol, así como de una mezcla de los tres en las siguientes proporciones

	Glucosa	Glicerol	Eritritol
masa (mg)	8.7	5.4	8.7
n° moles	0.048	0.058	0.071
relación molar	1	1.20	1.48

Se analizaron los TMS éteres por cromatografía gas líquido utilizando las siguientes condiciones: Columna iv ; T° columna programada entre 70° y 200° a razón de 6°/min ; T° detector: 300° ; T° inyección 200° ; flujo de N₂: 30ml/min

Oxidación con periodato del polialcohol :el polialcohol (10 mg) se oxidó con IO₄Na bajo las mismas condiciones que se describió anteriormente para el polisacárido sin oxidar . Se midió el consumo de oxidante sobre alícuotas de 0.2 ml extraídas de la mezcla de oxidación a las 2h,4h,8h, y 24h , siendo en todos los casos el calor obtenido equivalente al del blanco ,y por lo tanto el consumo de oxidante despreciable.Paralelamente se dosó la glucosa remanente (0.5 ml),obteniéndose para la misma un valor constante de 4% (0.04 moles de glucosa por mol de glucosa anhidra).

TABLA 46

DADA DE GLUCOSA REMANENTE EN LA OXIDACION CON PERIODATO

Muestra	Volumen tomado	Absorbancia	moles de glucosa	moles de glucosa/ mGa
Glucosa 10^{-3} M	0.1 ml	0.105	0.1	
* Glucosa 10^{-3} M	0.2 ml	0.220	0.2	
Glucosa 10^{-3} M	0.3 ml	0.310	0.3	
Glucosa 10^{-3} M	0.4 ml	0.420	0.4	
Glucosa 10^{-3} M	0.5 ml	0.550	0.5	
Oxidación 3 horas	0.5 ml	1.0	2.2	0.32
1 días	0.5 ml	0.6	1.2	0.17
3 días	0.5 ml	0.5	1.1	0.166
4 días	1.0 ml	0.77	0.69	0.10
8 días	1.0 ml	0.30	0.30	0.04
9 días	1.0 ml	0.20	0.20	0.03
10 días	1.0 ml	0.20	0.20	0.03

TABLA 47

RELACION ERITRITOL:GLICEROL:GLUCOSA EN EL POLIALCOHOL HIDROLIZADO

	Relación de áreas	Relación molar
Standard	1.88:0.91: 0.7	1.6 : 0.81 : 0.6
Muestra	4.1 : 1.9: 0.4	64: 29: 6
	9.3 : 4.6: 1.0	62: 30: 6.6
	1.1: 0.51: 0.14	63:29: 7

DETERMINACION DEL GRADO DE POLIMERIZACION

La determinación se realizó según el método descripto por Unrau y Smith(1957)

El polisacárido (27 mg) se disolvió en 10 ml de agua, se agregaron 25 mg de borohidruro de sodio y se mantuvo durante 20 horas con agitación constante. Se destruyó el exceso de borohidruro de sodio por agregado de ácido acético gota a gota y se ajustó el pH a 7.5 con solución saturada de bicarbonato de sodio. Se agregaron 25 mg de metaperiodato de sodio y la mezcla se dejó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 4 días. El exceso de oxidante se destruyó por agregado de 7.5 ml de ácido sulfúrico 1N y 2.5 ml de arsenito de sodio 1M. La mezcla se dializó contra igual volumen de agua destilada durante 24 horas. Se tomaron alícuotas (1 ml) del dializado y se realizó sobre ellas la determinación de formaldehído según la técnica general descripta. Las determinaciones se efectuaron por duplicado y los resultados pueden observarse en la Tabla 48

TABLA 48

DETERMINACION DEL GRADO DE POLIMERIZACION DEL POLISACARIDO

Muestra	Absorbancia	Formaldehído (μ moles/ml)
Testigo I	0.15	0.0375
Testigo II	0.29	0.075
Testigo III	0.45	0.1125
Testigo IV	0.71	0.1775
Polisacárido	0.10	0.024
	0.095	0.023

O sea que 27 mg del polisacárido dan origen a 1.344 μ moles de formaldehído, lo cual implica un Peso Molecular de 20.000 si se considera que la molécula terminal está unida a través del O-6 ó 40.000 si se considera que la molécula terminal está unida a través del oxígeno del C-4.

METILACION DEL POLISACARIDO

Se utilizó la técnica descripta por Hakomori (1964) según la adaptación de Sandford y Conrad (1966).

Primariamente se generó el anión metilsulfinilo (Corey y Chaykovsky, 1952)

Se pesó un gramo de hidruro de sodio (recubierto en un 55% por aceite mineral) en un balón de tres bocas. Se lavó con n-hexano (3 x 30 ml) agitando la solución y decantando después de cada lavado. Después del tercer lavado se adaptó un refrigerante tapado a una de las bocas del balón y se sacó el n-hexano residual por sucesivas evacuaciones con una bomba de vacío. Luego se conectó un tubo de N_2 , se destapó el refrigerante y se hizo pasar un flujo continuo de gas. Se agregó por la tercer boca dimetilsulfóxido (15 ml) previamente destilado sobre hidruro de calcio a Presión reducida y guardado sobre tamices moleculares Linde, tipo 4A. La solución se agitó con un agitador magnético y se mantuvo en baño de agua a 50° hasta que cesó la evolución de hidrógeno y la solución se puso verde clara (aproximadamente una hora)

El polisacárido (90 mg) previamente liofilizado de una solución acuosa y secado a 40°/1 mm durante dos horas, se disolvió en 10 ml de dimetilsulfóxido dentro de un balón de dos bocas. Se adaptó un refrigerante al balón y se agregaron 10 ml del anión metilsulfinilo. Se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas, haciendo pasar un flujo continuo de N_2 durante ese tiempo. Se colocó luego la solución en un baño de hielo y se agregaron gota a gota 3 ml de yoduro de metilo a una velocidad tal que la temperatura no subiera de 25°. Se dejó agitando durante toda una noche y luego se dializó la solución contra agua corriente. Se liofilizó y el liofilizado se extrajo con cloruro de metileno. Se llevó a seco a Presión reducida.

El producto obtenido (80 mg) mostraba una pequeña banda de absorción en el infrarrojo en la zona correspondiente al OH y el %OCH₃ era de 36.48

Se intentó una segunda metilación del polisacárido utilizando el mismo método pero se obtuvieron apenas unos 20 mg de un producto con gran contenido en OH (18) y cuyo % OCH_3 era de 16%. Todos los intentos de remetilar el polisacárido según la técnica de Hakamori (cuidando las condiciones de reacción: temperatura, alcalinidad del medio, tiempo de contacto) fueron infructuosos.

Se procedió entonces a remetilar el polisacárido según el método descrito por Purdie e Irvine (1903).

El polisacárido parcialmente metilado se disolvió en 10 ml de ICH_3 y se le agregaron en porciones, 2 gramos de óxido de plata recientemente preparado. La mezcla de reacción se calentó a reflujo con agitación en baño de agua a 60° durante 10 horas. Se repitió el procedimiento tres veces más sin aislar el producto intermedio. Luego se separó el óxido de plata por filtración a través de un lecho de celite en una placa filtrante, lavándose cuidadosamente con cloruro de metileno caliente. El filtrado se secó con SO_4Na_2 anhidro y se llevó a seco (290 mg).

Purificación del polisacárido metilado

El producto obtenido se calentó a reflujo con benceno y se separó el insoluble. Se precipitó el polisacárido metilado por agregado de éter de petróleo a la solución bencénica, se centrifugó, lavó con éter de petróleo y se secó a $40^\circ/10^{-2}\text{ mm}$ sobre P_2O_5 . El % OCH_3 era de 39.72.

Propiedades

El polisacárido metilado presentaba una pequeña banda de absorción en la zona del OH. El espectro infrarrojo se hizo con una película del polisacárido preparada de la siguiente manera: 5 mg se disolvieron en 1 ml de cloruro de metileno y esta solución se colocó sobre una pastilla de ClNa evaporando el solvente por pasaje de aire caliente.

Hidrólisis del polisacárido parcialmente metilado

Se disolvió el polisacárido parcialmente metilado (140 mg) en 5 ml de ácido sulfúrico 66% enfriando externamente con un baño de hielo. Se dejó a temperatura ambiente durante 3 horas y luego se diluyó el H_2SO_4 hasta una concentración del 12% por agregado de 15 ml de agua cuidando que la temperatura no se elevara bruscamente.

La solución se calentó a 100° durante 8 horas. Se neutralizó con hidróxido de bario y los sólidos se separaron por filtración a través de un lecho de celite lavándose con agua y metanol caliente. El filtrado se descationizó por agitación con resina Dowex 50 (H^+) y se llevó a seco (100 mg).

La cromatografía en papel del hidrolizado (solvente 6) mostró las siguientes manchas, usando como revelador el reactivo c

R_f 0.84 , rosada , coincidente con 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucosa

R_f 0.67 , amarilla, coincidente con 2,3,4-tri-O-metil-D-glucosa

R_f 0.61 y 0.55 , rosadas, coincidentes con los dos anómeros de 2,3,6-tri-O-metil-D-glucosa

R_f 0.23 , amarilla, coincidente con la 2,3-di-O-metil-D-glucosa

Una mancha prácticamente en el lugar de siembra, marrón, que podría ser glucosa o alguna glucosa monometilada.

Se prepararon los TMS éteres y acetatos del hidrolizado previamente reducido y de muestras auténticas (reducidas) de glucosas parcialmente metiladas, según la técnica general descripta y se analizaron por cromatografía gas líquido. Los resultados obtenidos así como las condiciones utilizadas se ven en la Tabla 49

T/11A 49

CRMATICRATIA GAS LIQUIDO DE GLUCOSAS PARCIALMENTE METILADAS

Muestra	Tr (relativo a 2,3,4,6-tetra-O-metil-glucitol)	
	TMS (a)	Acetatos (b)
2,3,4,6-tetra-O-metilglucitol	1.00 (10'12")	1.00 (11'36")
2,3,4-tri-O-metilglucitol	1.50	2.02
2,3,6-tri-O-metilglucitol	1.40	2.02
3,4,6-tri-O-metilglucitol	1.40	1.80
2,4,6-tri-O-metilglucitol	1.40	1.85
2,3-di-O-metilglucitol	1.60	4.00
3-O-metilglucitol	2.20	
Polisacárido (50% 39.72)	1.40	2.02
hidrolizado y reducido	1.50	
	1.55	3.30
	1.60	4.0
	1.70	

Condiciones de operación

(a) columna ii - Temperatura de la columna programada entre 100° a 220° a razón de

6° /min - Temperatura detector 300° - Temperatura inyector 200°

Flujo de N₂ 30 ml/min

(b) columna iii - Temperatura de la columna isotérmica a 190°

Temperatura detector 300° - Temperatura inyector 250° - Flujo de N₂ 30 ml/min

METILACIÓN TOTAL DEL POLISACÁRIDO

Se metiló el polisacárido (300 mg) según la técnica de Hakamori descripta. Se obtuvieron 270 mg con los cuales se hizo una curva de fraccionamiento (Chanda, Hirst y col, 1950).

Se trató el polisacárido metilado con una mezcla (3 ml) de éter de petróleo-benceno, aumentando gradualmente la proporción del primero. En cada caso la mezcla se reflujo en un baño de agua durante dos horas. Se decantó la solución. Se sacó el solvente a presión reducida y se secó el residuo a 90° / 0.1 mm sobre P_2O_5 hasta peso constante. Los resultados pueden observarse en la Tabla 50.

La fracción 3 (60 mg) no presentaba banda de absorción en el espectro infrarrojo en la zona correspondiente al OH. Se hidrolizó y se trató de manera similar a la descripta para el polisacárido parcialmente metilado.

La cromatografía en papel del hidrolizado (solvente 6) reveló las siguientes manchas (reactivo \underline{c})

Rf 0.84 rosa (coincidente con 2,3,4,6-tetra-O-Metil glucosa)

Rf 0.68 amarilla (coincidente con 2,3,4-tri-O-metil glucosa)

Rf 0.62 y 0.57 rosadas (coincidentes con los anómeros de la 2,3,6-tri-O-metil glucosa)

Rf 0.24 marrón (coincidente con 2,3-di-O-metil glucosa)

Rf 0.22 amarilla

Se prepararon los TMS éteres y acetatos de standards reducidos de glucosas parcialmente metiladas y del producto reducido de la hidrólisis del polisacárido totalmente metilado. Se analizaron por cromatografía gas líquido. Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla 51.

TABLA 50

FRACCIONAMIENTO DEL POLISACARIDO PETILADO OBTENIDO POR EL METODO DE HAZENHAI

Fracción	Benceno; éter de petróleo	Fund. %	% CMA	20 D
1	10 : 50	0.6	- (a)	-
2	10 : 40	2.0	-	-
3	30 : 70	35.0	43.73	+ 140
4	40 : 60	37.5	35.98	+ 144
5	60 : 40	5.0	35.05	+ 136
6	residuo	8.0	11.43	-

(a) -- indica que no se hizo la determinación

TABLE 51CHROMATOGRAPHY OF LIQUIDS OF GLUCOSAS PARTIALLY METHYLATED

Muestra	Tr (relativo a 2,3,4,6-tetra-O-metilglucitol)		
	TMS (a)	Acetatos (a)	Acetatos (b)
2,3,4,6-tetra-O-metil glucitol	1.00 (10')	1.00 (8'24")	1.00 (11'35")
2,3,4-tri-O-metil glucitol	2.4	1.75	2.05
2,3,6-tri-O-metil glucitol	2.2	1.63	2.05
2,4,6-tri-O-metil glucitol	2.2	1.63	1.8
2,3-di-O-metil glucitol	2.53	2.00	4.00
3,4-di-O-metil glucitol		2.10	
2,4-di-O-metil glucitol		2.25	3.6
3-O-metil glucitol	3.2	2.5	
Polisacárido metilado	1.00	1.00	1.00
(% OMe 43.75) hidrolizado	2.2	1.63	2.05
y reducido	2.4	1.75	4.0
	2.48		
	2.53	2.0	
		2.15	

(a) Columna i- T° columna programada entre 130 y 220 °C a razón de 4°/min

T° detector 300° - T° inyector 250° - Flujo de N₂ 30 ml/min

(b) Columna ii - T° columna 190°

T° detector 300° - T° inyector 250° - Flujo de N₂ 30 ml/min

Se fraccionó una alícuota del hidrolizado (60 mg) en una columna de celulosa (15 x 1.5 cm) utilizando solvente 6. Se recogieron fracciones de 3 ml

Fracciones 1→3: el único componente observado era 2,3,4,6-tetra-O-metil glucosa (2 mg). Se hizo el espectro de masa de la fracción reducida y acetilada (Tabla 24)

Fracción 4: (5 mg) por cromatografía en papel (solvente 6, revelador c), se observaba una única mancha de Rf 0.67 amarilla, coincidente con la 2,3,4-tri-O-metil glucosa

El análisis por cromatografía gas líquido (condiciones a, Tabla 51) de la fracción reducida y acetilada indicaba sin embargo que, si bien era este el componente principal, había trazas de 2,3,6-tri-O-metil glucitol

Fracciones 5 y 6 (30 mg) consistía en una mezcla de las dos tri-O-metil glucosas.

Fracción 7 (6 mg) por cromatografía en papel (solvente 6, revelador c) aparecían dos manchas rosadas de Rf 0.61 y 0.55 coincidentes con la 2,3,6-tri-O-metil glucosa

La cromatografía gas líquido (condiciones a, Tabla 51) de esta fracción reducida y acetilada mostraba un único pico coincidente con el del 2,3,6-tri-O-metil glucitol.

Se purificó cuidadosamente el acetato del glucitol con cloruro de metileno, se llevó a seco y se hizo su espectro de masas (Tabla 21)

Fracción 8 (6 mg) consistía en una mezcla de 2,3,6-tri-O-metil glucosa y un producto cuyo Rf coincidía con el de la 2,3-di-O-metil glucosa

Fracción 9→16 (5 mg) aparecían dos manchas (solvente 6, revelador c) por cromatografía en papel de Rf 0.23 y 0.21 que se revelaban amarillo y marrón respectivamente

Las fracciones 5 y 6 se re cromatografiaron en una columna de dimensiones similares, pero se recogieron fracciones de 1.5 ml

Fracciones 1 → 8 (3 mg) parecía una única mancha por cromatografía en papel coincidente con la 2,3,4-tri-O-metil glucosa

El análisis por cromatografía gas líquido de esta fracción reducida y acetilada, indicaba que era el único producto trimetilado presente.

Se purificó el acetato de esta fracción reducida por extracción con cloruro de metileno (2 x 5 ml) y se hizo el correspondiente espectro de masas (Tabla 22)

Fracciones 9 → 16 (20 mg) era una mezcla de 2,3,4-tri-O-metil glucosa y 2,3,6-tri-O-metil glucosa

Fracciones 17 → 20 (3 mg) por cromatografía en papel parecía ser 2,3,6-tri-O-metil glucosa pura.

RESUMEN

El presente trabajo tuvo por objeto continuar con el estudio de la composición en Hidratos de Carbono de Cyttaria hariatii Fischer . Se encuentra dividido en varias partes:

- 1) Una descripción de los hongos del género Cyttaria ,así como un detalle de los trabajos químicos realizados sobre la única especie hasta el momento estudiada: Cyttaria hariatii Fischer
- 2) Se mencionan los distintos tipos de glucanos aislados de hongos y levaduras, clasificando los mismos de acuerdo al tipo y configuración de sus uniones glucosídicas.
- 3) Se resumen los principales métodos enzimáticos usados para el análisis de polisacáridos, haciendo especial mención de las enzimas amilolíticas
- 4) Se menciona brevemente la química y bioquímica de la trehalosa así como sus fuentes de extracción
- 5) Se describe la identificación y determinación cuantitativa de alfa,alfa-D-trehalosa y ácido D-arabino hexulosónico en un extracto acuoso del hongo.

Se caracterizó la trehalosa por sus propiedades físicas (punto de fusión y poder rotatorio), por las propiedades físicas de su octaacetato y por el Ir en c.g.l. Por hidrólisis cuantitativa con trehalasa se calculó que su porcentaje en el hongo está entre 0.22 y 0.30%

El cetoácido se caracterizó a través de los productos resultantes de su reducción y posterior lactonización. Se determinó que su porcentaje en Cyttaria hariatii Fischer es del 1% . Cabe aclarar que es esta la primera vez que se aísla ácido D-arabino hexulosónico libre de un producto natural.

6) Se detallan los métodos empleados en la elucidación de la estructura de un polisacárido aislados de Cytlaria harti Fischer, junto con una discusión de los resultados obtenidos.

Dicho polisacárido se aisló por precipitación con etanol de un extracto acuoso de Cytlaria harti Fischer, luego de eliminar el heteropolisacárido estudiado anteriormente. El producto obtenido entre 41 y 46% de etanol se purificó hasta constancia de poder rotatorio $[\alpha]_D^{20} + 171$ (H₂O). Se observaba un solo pico simétrico por ultracentrifugación y precipitaba de su solución acuosa en un estrecho rango de concentración etanólica, evidencias ambas de su homogeneidad. El grado de polimerización era 246 considerando que la unidad terminal está unida a través del O del C-4.

Por hidrólisis ácida total se obtuvo solamente glucosa y con amiloglucosidasa la hidrólisis fue cuantitativa.

La hidrólisis ácida parcial daba principalmente isomaltosa junto con maltosa, maltotriosa y oligosacáridos mayores. La acetólisis proporcionaba mayor proporción de maltosa y maltotriosa. Esto confirmaba la presencia de uniones alfa-D-(1→4) y alfa-D-(1→6) en el glucano.

El polisacárido se hidrolizaba sólo un 8% con alfa amilasa, mientras que con pululanasa se obtenía un poder rotatorio correspondiente a 32-33%. La cromatografía en papel del hidrolizado con pululanasa mostraba un único componente de R_f = maltotriosa. Esta fue posteriormente caracterizada por sus propiedades físicas (punto de fusión, poder rotatorio, espectro de resonancia magnética nuclear) y las de su acetato.

Cuando la hidrólisis con pululanasa se detuvo en un paso intermedio, se aislaron oligosacáridos consistentes en residuos de maltotriosas unidas a través del O-6.

Por estos resultados se postuló que el glucano era estructuralmente similar al "pululano" aislado de varias cepas de Pullularia pullulans y de Tremella mesenterica y que contenía una cadena principal consistente en residuos de maltotriosas unidas por el O del C-6 (unión alfa).

Los estudios de oxidación con IO₄⁻ permitieron confirmar estas suposiciones, si bien se encontró 3 - 7 % de glucosa sin oxidar lo cual sugiere la posibilidad de que existan uniones 1→3 o ramificaciones.

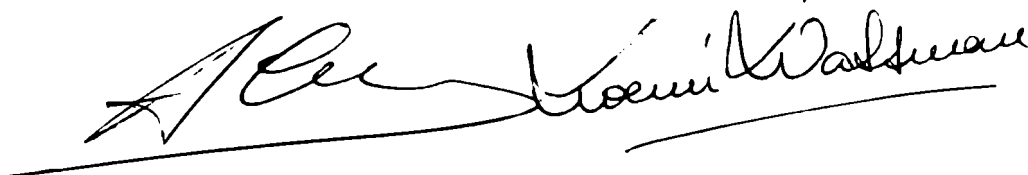
La metilación del glucano dio un producto con 43.8% de OCH_3 . La hidrólisis del producto metilado permitió identificar 2,3,4,6-tetra-O-Metil-glucosa ; 2,3,4 y 2,3,6-tri-O-Metil-glucosas (Cromatografía en papel, c.g.l. y espectros de masas) ; 2,3-di-O-Metil glucosa (cromatografía en papel y c.g.l.) y otro producto dimetilado, posiblemente 2,6-di-O-Metil glucosa . La determinación cuantitativa de los productos metilados demostró que hay dos puntos de ramificación cada 100 unidades de glucosa y que el exceso de glucosas dimetiladas respecto de la tetrametilglucosa (7%) se puede deber a una submetilación . No se encontró 2,4,6-tri-O-Metil-glucosa que permitiría confirmar la presencia de uniones 1--3

También en el pululano aislado de Pullularia pullulans se encontraron uniones 1--3, así como 2,3-dimetil glucosa entre los productos de metilación e hidrólisis.

Es esta la primera vez que se encuentra un pululano intracelular . En la Tabla siguiente se resumen las propiedades de los "pululanos" aislados de Pullularia pullulans , Tremella mesenterica y Cyttaria hariatoti Fischer.

TABLA
PROPIEDADES DE LOS PULULANOS DE DISTINTOS ORIGENES

Origen	$[\alpha]_D$	Grado polimer.	relación (1--4)/(1--6)	Observaciones
<u>Pullularia pullulans</u>	+ 192	300	1.5	
<u>Pullularia pullulans</u>	+ 190	250	2.0	glucosa luego de oxidación con IO_4^-
<u>Pullularia pullulans</u> Berkhout	+ 189		2.2	6% uniones 1--3
<u>Tremella mesenterica</u>	+ 185	200	2.0	
<u>Cyttaria hariatoti</u>	+ 172	246	2.2	4-7% glucosa luego de la oxidación con periodato



BIBLIOGRAFIA

- 1.- Abdel-Akher y Smith F., J. Am. Chem. Soc., 73, 5859 (1951)
- 2.- Abdulah M., Catley B.J., Lee Y.C., Robyt J., Wallenfels K. y Whelan W.J., Cereal Chem., 43, 11 (1966)
- 3.- Abdulah M. y Whelan W.J., Nature, 197, 979 (1963)
- 4.- Ainsworth "Introduction to Fungi", (1970)
- 5.- Alfes H., Bishop C.T. y Blank F., Can. J. Chem., 41, 2621 (1963)
- 6.- Anderson C.G., Howorth W.N., Raistrick H. y Stacey M., Biochem. J., 33, 272 (1939)
- 7.- Anderson D.M.W., Dea I.C.M., Maggs P.A. y Munro A.C., Carbohydr. Res., 5, 489 (1967)
- 8.- Andrew I.J., Nature, 203, 204 (1964)
- 9.- Aronson J.M., Cooper B.A. y Fullee M.S., Science, 155, 332 (1967)
- 10.- Ascher M., Mager J. y Leibowitz J., Nature, 156, 295 (1945)
- 11.- Axberg K., Björndal H., Pilotti A. y Svensson S., Acta Chem. Scand., 26, 1319 (1972)
- 12.- Bacon J.S.D., Farmer V.C., Jones D. y Taylor I.F., Biochem. J., 114, 555 (1969)
- 13.- Baddiley J., Buchanan J.G. y Thain E.M.J., J. Chem. Soc., 1944 (1953)
- 14.- Bailey J.M. y Whelan W.J., Biochem J., 62, 540 (1957)
- 15.- Ballio A.I., Divittorio V. y Russi S., Biochem. Biophys., 107, 177 (1964)
- 16.- Balls A.K., Walden M.K. y Thompson R.R., J. Biol. Chem., 173, 9 (1948)
- 17.- Banks W. y Greenwood C.T., Carbohydr. Res., 6, 177 (1968)
- 18.- Barber S.A., Bourne E.J. y Stacey M., Chem & Ind (London), 756 (1952)
- 19.- Barber S.A., Bourne E.J. y Stacey M., J. Chem. Soc., 3084 (1953)
- 20.- Barber S.A., Bourne E.J., O'Mant D.M. y Stacey M., J. Chem. Soc., 2448 (1957)
- 21.- Bartnicki-García S. y Lippman E., Biochim. Biophys. Acta, 136, 533 (1967)
- 22.- Bauer R., Zentr. Bakteriöl. Parasitenk., Abt II, 98, 392 (1938)
- 23.- Bell D.J. y Northcote D.H., J. Chem. Soc., 1944 (1950)
- 24.- Bender H. y Wallenfels K., Biochem. Biophys. Acta, 36, 309 (1959)
- 25.- Bender H. y Wallenfels K., Biochem. Z., 334, 79 (1961)
- 26.- Bhavanandan V.P., Bouveng H.O. y Lindberg B., Acta Chem. Scand., 18, 504 (1964)

- 27.- Bishop C.T. y Whitaker D.R., *Chem & Ind (London)*, 119 (1955)
- 28.- Bishop C.T., Blank F. y Gardner P.E., *Can. J. Chem.*, 38, 869 (1960)
- 29.- Bishop C.T., Perry M.D., Hulyalkar R.K. y Blank F., *Can J. Chem.*, 44, 2299 (1966)
- 30.- Björndal H. , Lindberg B. y Svensson S., *Acta Chem. Scand.*, 21, 1801 (1967, a)
- 31.- Björndal H. , Lindberg B. y Svensson S., *Carbohydr. Res.*, 15, 433 (1967, b)
- 32.- Björndal H. , Lindberg B., Pilotti A. y Svensson S., *Carbohydr. Res.*, 15, 339 (1970)
- 33.- Bobbit J.M., *Advanc. Carbohydr. Chem.*, 11, 1 (1956)
- 34.- Bourquellot E., *Bull. Soc. Mycol. Fr.*, 9, 189, 230 (1893)
- 35.- Brown R.G. y Lindberg B., *Acta Chem. Scand.*, 21, 2379 (1967)
- 36.- Bush D.A. y Horisberger M., *Carbohydr. Res.*, 22, 361 (1972)
- 37.- Cabib E. y Leloir L.F., *J. Biol. Chem.*, 231 , 259 (1958)
- 38.- Catley B.J., Robyt J.F. y Whelan W.J., *Biochem. J.*, 100, 5P (1966)
- 39.- Catley B.J. y Whelan W.J., *Arch. Biochem. Biophys.*, 143, 138 (1971)
- 40.- Ceccarini C. y Filosa M., *J. Cell Compt. Physiol.*, 66, 135 (1965)
- 41.- Clegg J.S. y Filosa M., *Nature*, 192 , 1077 (1961)
- 42.- Coley Smith J.R. y Dickinson D.J., *Soil. Biol. Biochem.*, 3, 27 (1971)
- 43.- Corey E.J. y Chaykovsky M., *J. Am. Chem. Soc.*, 84, 866 (1962)
- 44.- Cori G.T. y Larner J., *J. Biol. Chem.*, 188 , 17 (1951)
- 45.- Croon J., Herrström G., Kull G. y Lindberg B., *Acta Chem. Scand.*, 14, 1338 (1960)
- 46.- Chambrach A., Reifeld R.A., Wycoff M. y Zaccari J., *Anal. Biochem.*, 20, 150 (1967)
- 47.- Chanda S.K., Hirst E.L. Jones J.K.N. y Percival E.G.V., *J. Chem. Soc.*, 1289 (1950)
- 48.- Chihara G., Hamuro J., Haeda Y., Arai Y. y Fukuoka F., *Nature*, 225, 943 (1970)
- 49.- Chihara G., Haeda Y., Hamuro J., Sasaki T. y Fukuoka F., *Nature*, 222, 687 (1969)
- 50.- Chrzaszcz T y Tinkow D., *Biochem. Z.*, 207, 39 (1927)
- 51.- Dastur J.F., *Mem. Dept. Agr. India Bot. Ser.*, 5, 177 (1913)
- 52.- De Wilt H.G.J., *J. Chromat.*, 63, 379 (1971)
- 53.- Dox A.W. y Neidig R.E., *J. Biol. Chem.*, 18, 167 (1914)
- 54.- Dox A.W., *J. Biol. Chem.*, 20, 83 (1915)

- 55.- Drummond G.S., Smith E.E., Whelan W.J. y Tai H., F.E.B.S. Lett., 5, 85 (1969)
- 56.- Drummond G.S., Smith E.E. y Whelan W.J., F.E.B.S. Lett., 9, 136 (1970)
- 57.- Duff R.B., J. Chem. Soc., 2592 (1952)
- 58.- Dutton G.S., Gibney K.B., Jensen G.D. y Reid P.E., J. Chromat., 36, 152 (1968)
- 59.- Earl J.C. y Mc Gregor G.M., J. Proc. Roy. Soc. N. S. Wales, 63, 149 (1934)
- 60.- Ebert E. y Zenck M.H., Phytochemistry, 6, 309 (1967)
- 61.- Eegrove E., Z. Anal. Chem., 110, 22 (1937)
- 62.- Elbein A.D., J. Bacteriol., 94, 1520 (1967, a)
- 63.- Elbein A.D., J. Biol. Chem., 242, 403 (1967, b)
- 64.- Elinor N.P. y Matviera A.K., Biokhymika, 37, 225 (1972)
- 65.- Errera L., Comp. Rend., 101, 253 (1895)
- 66.- Evans D.R. y Dethier W.G., J. Insect Physiol., 1, 3 (1957)
- 67.- Evans R.B. y Manners D.J., Biochem. J., 125, 318 (1971)
- 68.- Fernández Cirelli A. y Lederkremer R. M. de, Chem & Ind (London), 1139 (1971)
- 69.- Fernández Cirelli A. y Lederkremer R. M. de, Anales Asoc. Quim. Arg., 60, 299 (1972)
- 70.- Fernández Cirelli A. y Lederkremer R.M. de, Carbohydr. Res., 48, 217 (1976)
- 71.- Fischer E., Bot. Zeit., 46, 813 (1888)
- 72.- Fischer E.H. y Stein E.A., Arch. Sci (Genova), 7, 131 (1954)
- 73.- Fischer E.H. y Stein E.A., Biochem. Prepn., 8, 27 (1961)
- 74.- Fischer E.H. y Stein E.A., Enzymes, 4, 313 (1960)
- 75.- Eleming y Pegler, Analyst, 88, 967 (1963)
- 76.- Fleury P. y Lange J., J. Pharm. Chim., 17, 107, 196 (1933)
- 77.- Frasser C.G. y Jennings H.J., Can. J. Chem., 49, 1804 (1971)
- 78.- French , Enzymes, 4, 345 (1960)
- 79.- French D. y Abdullah M., Biochem. J., 100, 6P (1966)
- 80.- French D. y Wild G.M., J. Am. Chem. Soc., 75, 2612 (1953)
- 81.- Friedman S., Methods Enzymol., 0, 372 (1966)
- 82.- Fukui T. y Nikuni Z., Agr. Biol. Chem. (Tokio), 33, 884 (1969)

- 83.- Camondt I.J., *Darwiniana*, 16, 461 (1971)
- 84.- Gorin P.A.J., Spencer J.F.I. y Mackenzie S.L., *Can. J. Chem.*, 44, 2087 (1966)
- 85.- Gunja Smith Z., Marshall J.J., Smith E.E. y Whelan W.J., *F.E.B.S. Lett.*, 12, 96 y 101 (1970)
- 86.- Hakamori S., *J. Biochem. (Tokio)*, 55, 205 (1964)
- 87.- Hallek F.E., *Chem. Abstracts*, 62, 11119 (1965)
- 88.- Hellerqvist C.G., Lindberg B. y Samuelson K., *Acta Chem. Scand.*, 22, 2736 (1968)
- 89.- Mehre E.J., Carlson A.S. y Hamilton D.M., *J. Biol. Chem.*, 177, 289 (1949)
- 90.- Hess K. y Dziengel F., *Ber.*, 68, 1594 (1935)
- 91.- Hobson P.N., Whelan W.J. y Peat S., *J. Chem. Soc.*, 1451 (1951)
- 92.- Hoffman G.C., Sunson B.W. y Timell T.E., *Carbohydr. Res.*, 20, 185 (1971)
- 93.- Horisberger M., Lewis B.A. y Smith F., *Carbohydr. Res.*, 23, 183 (1972)
- 94.- Hough L., Jones J.K.N. y Warman W.H., *J. Chem. Soc.*, 1702 (1950)
- 95.- How M.J., Withwall M.T., Cruickshank C.N.D., *Carbohydr. Res.*, 25, 341 (1972)
- 96.- How M.J., Withwall M.T. y Somers P.J., *Carbohydr. Res.*, 26, 21 (1973)
- 97.- Hraninsavljevic M., Javoljevic A., Milkovic-Stojanovic J., Dimitrijevic R. y Micovic. V., *Carbohydr. Res.*, 39, 115 (1975)
- 98.- Hudson C.S. y Johnson J.M., *J. Am. Chem. Soc.*, 37, 2748 (1915)
- 99.- Hutson D.H. y Weigel H., *Biochem. J.*, 88, 588 (1963)
- 100.- Ishak M.F. y Painter T., *Carbohydr. Res.*, 32, 227 (1974)
- 101.- Jeanloz R.W., *Helv. Chim. Acta*, 27, 1501 (1944)
- 102.- Johnson J. Jr., Kirkwood S., Misaki A., Nelson T.E., Scaletti J.V. y Smith F., *Chem & Ind (London)*, 820 (1965)
- 103.- Johnston I.R., *Biochem. J.*, 96, 651 y 659 (1965)
- 104.- Jones G.H. y Ballon C.E., *J. Biol. Chem.*, 244, 1043 (1969)
- 105.- Katz J. y Hassid W. Z., *Arch. Biochem. Biophys.*, 30, 272 (1951)
- 106.- Keleman y Whelan W.J., *Arch. Biochem. Biophys.*, 117, 423 (1966)
- 107.- Kieckebusch W. y Lang K., *Chem Abstracts*, 58, 3718 g (1963)

- 108.- Kottman P. y Langerhock A. von, *J. Microbiol. Serol.*, 29, 169 (1963)
- 109.- Lederman R. E. y Danelli M. F., *Anales Asoc. Quim. Arg.*, 55, 199 (1967)
- 110.- Lee E.Y.C. y Whelan W.J., *Arch. Biochem. Biophys.*, 116, 162 (1966)
- 111.- Lee E.Y.C., Carter J.H., Nielsen L.O. y Fischer E.H., *Biochemistry*, 9, 2347 (1970)
- 112.- Lee E.Y.C. y Whelan W.J., *Enzymes*, 5, 191 (1971)
- 113.- Leonard G.J. y Richards G.N., *Carbohydr. Res.*, 41, 143 (1975)
- 114.- Lineback D.R. y Baumann W.L., *Carbohydr. Res.*, 14, 341 (1970)
- 115.- Ljunggren E. y Svensson S., *Adv. in Carbohydr. Chem and Biochem.*, 29, 91 (1974)
- 116.- Lloyd J.B. y Whelan W.J., *Anal. Biochem.*, 30, 467 (1969)
- 117.- Mandels G.R. y Parrish F.W., *J. Bacteriol.*, 90, 1589 (1965)
- 118.- Manners D.J. y Khin Mannng, *J. Chem. Soc.*, 867 (1955)
- 119.- Manners D.J., Hyley J.F. y Stark J.R., *Biochem. J.*, 101, 323 (1966)
- 120.- Manners D.J., Masson A.J. y Sturgeon R.J., *Carbohydr. Res.*, 17, 109 (1971)
- 121.- Manners D.J., Masson A.J. y Paterson J., *Biochem. J.*, 135, 19, 31 (1973)
- 122.- Manners D.J. y Marshall J.J., *Phytochemistry*, 12, 547 (1973)
- 123.- Manners D.J., Masson J. y Paterson J., *Journal of Gen. Microbiol.*, 80, 411 (1974)
- 124.- Marechal L.R. y Belocopitow E., *Biochim. Biophys. Acta*, 198, 151 (1970)
- 125.- Marechal L.R. y Belocopitow E., *J. Biol. Chem.*, 247, 3223 (1972)
- 126.- Marshall J.J. y Whelan W.J., *F.E.B.S. Lett.*, 9, 85 (1970)
- 127.- Marshall J.J. y Whelan W.J., *Anal. Biochem.*, 43, 316 (1971)
- 128.- Marshall J.J. y Whelan W.J., *Anal. Biochem.*, 52, 642 (1973)
- 129.- Marshall J.J., *Biochem. Soc. Trans.*, 1, 445 (1973)
- 130.- Marshall J.J., *Adv. in Carbohydr. Chem. and Biochem.*, 30, 220 (1974)
- 131.- Maruo B. y Kobayashi T., *Nature*, 167, 606 (1951)
- 132.- Mathre D.E., *Can. J. Bot.*, 47, 1513 (1969)
- 133.- Matsuda K., Watanabe H., Fujimoto K. y Aso K., *Nature*, 191, 278 (1961)
- 134.- Mercier C., Frautz M. y Whelan W.J., *Eur. J. Biochem.*, 26, 1 (1972)
- 135.- Merdinger L. y Kohn P., *Can. J. Microbiol.*, 13, 1126 (1967)

- 135.- Meyer K.H., Spehr P.F. y Fischer F.H., *Helv. Chim. Acta* ,36,1924 (1953)
- 137.- Michaelis L. y Menten M.L., *Biochem Z.*,49,333 (1913)
- 138.- Miskin A., Johnson J.Jr, Kirkwood S., Scaletti J.V. y Smith F., *Carbohydr. Res.*,
6 , 150 (1968)
- 139.- Misra U.K. y French D., *Biochem. J.*,77 , 1P (1960)
- 140.- Mitchell R. y Sabar N., *Can. J. Microbiol.*,12 , 471 (1966)
- 141.- Montanary F.M., Weakley F.B. y Hilbert G.E., *J. Am. Chem. Soc.*,71,1682 (1949)
- 142.- Musgrave O.C. y Munro H.D., *J. Chem. Soc (C)* ,685 (1971)
- 143.- Myrbäck K., *Ergeb. Enzymforsch.*,10 ,169 (1949)
- 144.- Nakamura N. Oyama J. y Tanabe O., *Chem. Abstracts*,59,9281 (1963,a)
- 145.- Nakamura N. y Tanabe O., *Chem Abstracts*,59,13124 (1963,b)
- 146.- Nelson T.E., Johnson J., Jantzen E. y Kirkwood S., *J. Biol. Chem.*,244,5972(1969)
- 147.- Nikaido H. y Hassid W.Z., *Adv. Carbohydr. Chem.*,26,351 (1971)
- 148.- Nishikawa Y. Takada T., Chibata S. y Fukuoka F., *Chem. and Pharm. Bull (Japan)*,
17,1910 (1969)
- 149.- Noble D.W. y Sturgeon R.J., *Carbohydr. Res.*,12,448 (1970)
- 150.- Nordin J.H., Hasegawa S., Smith F. y Kirkwood S., *Nature*,210,303 (1966)
- 151.- Northcote D.H., *Biochem. J.*,53 , 348 (1953)
- 152.- Ohle H. y Wolter R., *Ber.*,63 B, 843 (1930)
- 153.- Panek A., *Arch. Biochem. Biophys.*,98,349 (1962)
- 154.- Parrish F.W., Perlin A.S. y Reese E.T., *Can. J. Chem.*,38,2094 (1960)
- 155.- Pazur J.H., *J. Am. Chem. Soc.*,77 ,1015 (1955)
- 156.- Pazur J.H. y Okada S., *Carbohydr. Res.*,4,371 (1967)
- 157.- Pazur J.H., Knull H.R. y Simpson D.L., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*,40,110 (1970)
- 158.- Peat S., Thomas G.J. y Whelan W.J., *J. Chem. Soc.*,722 (1952)
- 159.- Peat S., Whelan W.J. y Hinson K.A., *Nature*,170,1056 (1952)
- 160.- Peat S., Whelan W.J., Hobson P.N. y Thomas G.J., *J. Chem. Soc.*,4440 (1954)
- 161.- Peat S., Whelan W.J. y Edwards T.E., *J. Chem. Soc.*,3862 (1958)

- 186.- Sumner R. y French D., J. Biol. Chem., 222, 469 (1956)
- 185.- Sturgeon R.J., Carbohydr. Res., 17, 115 (1971)
- 184.- Stein E.A. y Fischer E.H., Biochem. Prepn., 8, 34 (1961)
- 183.- Somogyi y Nelson, J. Biol. Chem., 160, 61 (1945)
- exp. Biol., 29, 930 (1970)
- 182.- Smith E.E., Drummond G.S., Marshall J.J. y Whelan W.D., Fed. Proc. Am. Soc. 454 (1971)
- 181.- Shida M., Kato T., Sasaki K., y Matsuda K., J. Agric. Chem. Soc. (Japan), 45
- 180.- Sentheshanmuganathan S. y Nickerson W.J., J. Gen. Microbiol., 27, 451 (1962)
- 179.- Schultze J.C. y Ankel H., J. Bacteriol., 113, 627 (1973)
- 178.- Schmidt G.C., Fisher C. y Mc Owen J.M., J. Pharm. Sci., 52, 468 (1963)
- 177.- Sandford P.A. y Conrad H.E., Biochemistry, 5, 1508 (1966)
- 176.- Salkowski C., Z. Physiol. Chem., 92, 75 (1914)
- 175.- Sakano Y., Higuchi M. y Kobayashi T., Arch. Biochem. Biophys., 153, 180 (1972)
- 174.- Sakano Y., Masuda N. y Kobayashi T., Agr. Biol. Chem., 35, 971 (1971)
- 173.- Sacktor B., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 60, 1007 (1968)
- 172.- Rosenthal A.J., J. Polymer Sci., 51, 111 (1961)
- 371 (1962)
- 171.- Nickes C.L., Hem E.A., Maccatelli E.A. y Ott W.H., Arch. Biochem. Biophys., 69,
Phycol., 40, 1248 (1952)
- 170.- Reiserer H.J., Goldschmidt H.B., Ledringham G.A. y Perlman A.S., Can. J. Biochem.
- 169.- Reese E.T., Loh J.E. y Parrish F.W., J. Bacteriol., 160, 1151 (1969)
- 168.- Reese E.T. y Kandel M., Can. J. Microbiol., 10, 103 (1964)
- 167.- Reese E.T. y Perlman A.S., Biochem. Biophys. Res. Commun., 12, 194 (1963)
- 166.- Ralph B.J. y Bender V.J., Chem & Ind (London), 1181 (1965)
- 165.- Purdie T. e Irvine J.C., J. Chem. Soc., 83, 1021 (1903)
- 164.- Proskurnikov N.J., Biochem. Z., 167, 68 (1926)
- 163.- Pritchard J.B., Anal. Chem., 29, 1967 (1956)
- 162.- Perlman A.S. y Taber W.A., Can. J. Chem., 41, 2278 (1963)

- 187.- Sundarajan P. H., Marchessault B. H., Quigley G.J. y Sarko A., J. Amer. Chem. Soc., 93, 2001 (1973)
- 188.- Singh P.P., Whistler R.L., Tokusen H. y Nakahara W., Carbohydr. Res., 32, 245 (1974)
- 189.- Sweeley C.C., Bentley R., Makita M. y Wells W.F., J. Amer. Chem. Soc., 85, 2497 (1963)
- 190.- Taguchi R., Kikuchi Y., Sakano Y. y Kobayashi T., Agric. Biol. Chem., 37, 1523 (1973)
- 191.- Takeda K., Chem. Abstracts, 30, 4823 (1936)
- 192.- Takeda T., Nishikawa Y. y Shibata S., Chem. and Pharm. Bull (Japan), 18, 1074 (1970)
- 193.- Thoma J.A., Sakim J. y Stewart L., Biochem. Biophys. Res. Commun., 12, 350 (1963)
- 194.- Trevelyan W.E., Procter D.P. y Harrison J.S., Nature, 166, 444 (1950)
- 195.- Tung K.K. y Nordin J.H., Anal. Biochem., 29, 84 (1969)
- 196.- Tung K.K. y Nordin J.H., Anal. Biochem., 33, 164 (1970)
- 197.- Ueda S., Fujita K., Komatsu K. y Nakashima Z., Appl. Microb., 11, 2111 (1963)
- 198.- Unrau A.M. y Smith F., Chem and Ind. (London), 330 (1957)
- 199.- Usui T., Yokoyama M., Yamaoka N., Matsuda K. y Tuzimura K., Carbohydr. Res., 33, 105 (1974)
- 200.- Wallenfels K., Bender H., Kerlich G. y Bechtler G., Angew. Chem., 73, 245 (1961)
- 201.- Wallenfels K., Kerlich G., Bechtler G. y Freudenberg D., Biochemische Z., 341, 433 (1965)
- 202.- Wallenfels K., Bender H. y Rached I.R., Biochim. Biophys. Res. Commun., 22, 254 (1966)
- 203.- Wallenfels K., Rached I.R. y Hucho D., European J. Biochem., 7, 231 (1969)
- 204.- Wang M.C. y Bartnicki García S., J. Gen. Microbiol., 64, 41 (1970)
- 205.- Wang M.C. y Bartnicki García S., Carbohydr. Res., 37, 331 (1974)
- 206.- Warsi S.A. y Whelan W.J., Chem and Ind (London), 1573 (1957)
- 207.- Watanabe T., Kawamura S., Sasaki H. y Matsuda H., Stærke, 21, 18 y 44 (1969)
- 208.- Weygand F., Perkow W. y Kuhner P., Ber., 84, 594 (1951)
- 209.- Whelan W.J., Biochem. Soc. Symp., 11, 17 (1953)
- 210.- Whelan W.J., Bailey J.M. y Roberts P.J.P., J. Chem. Soc., 1293 (1953)

- 211.- Whelan W.J., Methods Carbohydr. Chem., 4, 261 (1964)
- 212.- Whistler R.L. y Be Miller J.N., J. Amer. Chem. Soc., 78, 163 (1956)
- 213.- Wiernik M., Anales Asoc. Quím. Argentina, 50, 347 (1962)
- 214.- Wiggers H., Ann, 1, 173 (1832)
- 215.- Wilson C.M., Anal. Chem., 31, 1199 (1959)
- 216.- Wolfrom M.L., Lassetre E.N. y O'Neill A.N., J. Amer. Chem. Soc., 73, 595 (1951)
- 217.- Wolfrom M.L., Thompson A. y Timberlake C.E., Cereal Chem., 40, 82 (1963)
- 218.- Yokobayashi K., Misaki A. y Harada T., Biochim. Biophys. Acta, 212, 458 (1970)
- 219.- Young E.G. y Rice F.A.H., J. Biol. Chem., 164, 35 (1946)
- 220.- Yu R.J., Bishop C.T., Cooper F.P., Blank F. y Hasencleuer H.F., Can. J. Chem., 45
2264 (1967)
- 221.- Yuen S., Process Biochemistry, 9, 7 (1974)
- 222.- Zechmeister L. y Toth G., Biochem. Z., 270, 309 (1934)
- 223.- Zechmeister L. y Toth G., Biochem. Z., 204, 133 (1936)
- 224.- Zevenhuizen L.P.T. y Bartnicki García S., Biochemistry, 8, 1496 (1969)
- 225.- Zevenhuizen L.P.T. y Bartnicki García S., J. Gen. Microbiol., 61, 183 (1970)
- 226.- Zonnaveid B.J.M., Biochim. Biophys. Acta, 249, 506 (1971)
- 227.- Zonnaveid B.J.M., Biochim. Biophys. Acta, 273, 174 (1972)